

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

**Untersuchungen zur Beteiligung von Proteasen an der kälteinduzierten  
Apoptose von Rattenleberendothelzellen**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Thorsten Roland Döppner  
aus  
Duisburg  
2004

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel
1. Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. med. U. Rauen
2. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Esche
3. Gutachter	Priv.-Doz. Dr. med. T. Noll, Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2005

**Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

**Originalarbeiten:**

Doeppner, T. R., Grune, T., de Groot, H., Rauen, U. (2003): Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: involvement of the proteasome. Transplantation 75, 1946-53.

**Abstracts:**

Döppner, T. R., Grune, T., de Groot, H., Rauen, U. (2002): Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: involvement of the proteasome. Cryobiology 45, 256.

**Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgender Tagung zur Fachdiskussion gestellt:**

8. Tagung „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“ in Halle / Saale (Nov. 2001).

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	
1.1	Lebertransplantation und -konservierung	1
1.2	Klassische Mechanismen der Konservierungsschädigung	3
1.3	Kälteinduzierte Apoptose	8
1.4	Proteasen und ihre Beteiligung an apoptotischen Prozessen	10
1.5	Beteiligung von Proteasen an der Konservierungsschädigung der Leber	14
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN</b>	
3.1	Chemikalien	17
3.2	Zusammensetzung der Konservierungslösungen HTK und UW	18
3.3	Zellkultur	18
3.4	Experimentelles Vorgehen	19
3.5	Übersicht über die verwendeten Hemmstoffe	20
3.6	Beurteilung der Zellschädigung	21
3.7	Bestimmung der Proteaseaktivitäten	
3.7.1	Allgemeines Procedere	22
3.7.2	Bestimmung der Cystein- und Serinproteaseaktivitäten	23
3.7.3	Bestimmung der Calpainaktivität	23
3.7.4	Bestimmung der Cathepsin B-Aktivität	24
3.7.5	Bestimmung der Proteasomaktivität	24
3.7.6	Bestimmung der Caspaseaktivität	24
3.8	Immunopräzipitation des Proteasoms	25
3.9	Proteinbestimmung nach Bradford	25
3.10	Thiobarbitursäure-Test	25
3.11	Statistik	26
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	
4.1	Kälteinduzierte Apoptose kultivierter Leberendothelzellen	27
4.2	Effekte von Proteaseinhibitoren auf die kälteinduzierte Apoptose kultivierter Leberendothelzellen	34
4.2.1	Effekt des Calpaininhibitors Cbz-Val-Phe-Methylester	35
4.2.2	Effekte der Caspaseinhibitoren z-VAD.fmk und z-DEVD.fmk	36

4.2.3	Effekt des Matrixmetalloproteaseinhibitors $\alpha_2$ -Makroglobulin	37
4.2.4	Effekt des Aspartatproteaseinhibitors Pepstatin A	38
4.2.5	Effekte der Cathepsininhibitoren z-FA.fmk und CA-074	39
4.2.6	Effekte der Serinproteaseinhibitoren TLCK, TPCK, Aprotinin und PMSF	40
4.2.7	Protektion durch den Serinproteaseinhibitor DCI	43
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung der Proteaseaktivitäten nach Kaltinkubation</b>	<b>46</b>
4.3.1	Bestimmung der Proteaseaktivität mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC nach Kaltinkubation in HTK-Lösung	48
4.3.2	Bestimmung der Proteaseaktivität mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC nach Kaltinkubation in HTK-Lösung	49
4.3.3	Effekte des Serinproteaseinhibitors DCI auf die Suc-Ala-Ala-Ala-AMC und Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden Proteaseaktivitäten	50
4.3.4	Bestimmung der Cathepsin B-Aktivität und der Cysteinproteaseaktivität nach Kaltinkubation in HTK-Lösung	51
4.3.5	Bestimmung der Caspase 3-Aktivität nach Kaltinkubation in HTK-Lösung	52
4.3.6	Bestimmung der Proteaseaktivitäten mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC und Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC nach Kaltinkubation in UW-Lösung	53
4.3.7	Differenzierung der Suc-Ala-Ala-Ala-AMC und Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden Proteasen	54
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung und Identifizierung der Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden Proteaseaktivität</b>	<b>58</b>
<b>4.5</b>	<b>Eisenabhängigkeit der Proteaseaktivierung</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>88</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Lebertransplantation und -konservierung**

Die Lebertransplantation gilt heute als die Therapie der Wahl für viele Erkrankungen, die zur terminalen Leberinsuffizienz führen. Letztere entwickelt sich als Konsequenz der pathophysiologischen Antworten des Organs auf vielerlei einwirkende Noxen (z. B. Hepatitisviren, Alkohol und verschiedene Medikamente/Toxine).

Die erste orthotope Lebertransplantation beim Menschen wurde bereits 1963 durchgeführt (Starzl et al., 1965). Gerade in den letzten 15-20 Jahren haben sich im Bereich der Lebertransplantation bedeutende Fortschritte erzielen lassen. Diese sind zum einen der Einführung des Cyclosporin A (und der damit deutlich verbesserten Immunsuppression) in den achtziger Jahren zu verdanken, zum anderen aber auch der Einführung der University of Wisconsin-Konservierungslösung (UW-Lösung) von Belzer und Southard im Jahre 1988 (Belzer & Southard, 1988).

In den Anfängen der (in den späten fünfziger Jahren noch experimentellen) Transplantation war die Überlebenszeit des explantierten Organs durch die Lagerung bei Normothermie auf weniger als 30 Minuten begrenzt (Goodrich et al., 1956). In späteren Jahren wurde daher versucht, durch kontinuierliche maschinelle Perfusion des Organs, ein Verfahren, das einen nicht unerheblichen logistischen wie auch finanziellen Aufwand hatte, die Überlebenszeit des Organs nach Explantation zu verlängern. 1971 kam schließlich zum ersten Mal die alleinige Kaltlagerung der Leber als Konservierungsmethode zur Anwendung (Abouna et al., 1971). Durch die Hypothermie des Gewebes (0-4°C) nimmt der Zellmetabolismus entsprechend der van't Hoffschen Regel ab. Somit werden sowohl der Sauerstoff- als auch der Substratverbrauch in den Zellen während der Konservierungszeit deutlich reduziert. Die Kaltlagerung des Organs bei 4°C in speziellen Lösungen (den so genannten Konservierungslösungen) wie der Collins-Lösung bzw. ihrer Modifikation, der Euro-Collins-Lösung, erlaubten so letztlich eine Lagerungszeit des Organs von bis zu 8-10 Stunden (Blankensteijn & Terpstra, 1991; Spiegel et al., 1998). Durch die Einführung der UW-Lösung jedoch ließ sich diese Zeit auf maximal 20-24 Stunden verlängern (Blankensteijn & Terpstra, 1991; D'Alessandro et al., 1994). Neben der immer noch am häufigsten verwendeten UW-Lösung sind gegenwärtig jedoch auch noch andere Konservierungslösungen im klinischen Gebrauch, so z. B. die vorwiegend im europäischen Raum ursprünglich als kardioplegische Lösung verwendete Histidin-

Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK-Lösung) nach Bretschneider (Lamesch et al., 1990; Spiegel et al., 1998; Upadhy & Strasberg, 2000).

Der oben beschriebenen Verlängerung der Konservierungszeit (durch die Verwendung von Hypothermie und Konservierungslösungen) ist es schließlich zu verdanken, dass sich die Transplantation der Leber von einer Notfalloperation zu einem dringlichen Eingriff entwickelte, mit der Möglichkeit einer besseren präoperativen Vorbereitung und einem besseren postoperativen Ergebnis für den Patienten (Blankensteijn & Terpstra, 1991).

Trotz der Erfolge in den letzten zwei Jahrzehnten in der Lebertransplantation kommt es - je nach Literaturangabe - in 2-25% der Fälle zum primären Versagen des Spenderorgans (Clavien et al., 1992; Lemasters et al., 1995; Jaeschke, 1996). Das bedeutet, dass bei 772 transplantierten Lebern (inklusive Leberteiltransplantationen) im Jahr 2003 allein in Deutschland (Eurotransplant, Quelle: <http://www.eurotransplant.nl/index.php?id=leber>) statistisch gesehen bis zu 193 Organe von einem primären Transplantatversagen betroffen sind. Dieses lässt sich zum einen auf Spenderfaktoren wie eine schlechte nutritive Versorgung, Drogen- und Alkoholabusus zu Lebzeiten des Spenders sowie Organischämien und parenterale Ernährung im Rahmen des zum Hirntod des Spenders führenden Geschehens zurückführen. Zum anderen trägt jedoch die Konservierung selbst erheblich zur Organschädigung bei (Jaeschke, 1996; Clavien, 1998; Gao et al., 1998; Bilzer & Gerbes, 2000).

## **1.2 Klassische Mechanismen der Konservierungsschädigung**

Eine protrahierte Konservierung der Leber bei 4°C führt - abhängig von etwaigen Spenderfaktoren - zu einer deutlichen Schädigung des Transplantats, der so genannten Konservierungsschädigung (Blankensteijn & Terpstra, 1991; Clavien et al., 1992).

Die Konservierungsschädigung betrifft bei weitem nicht alle Zellen des Organs gleichermaßen (Lemaster & Thurman, 1993; Jaeschke, 1996). Es ist mittlerweile anerkannt, dass die Hauptschädigung vor allem die sinusoidalen Endothelzellen betrifft, wohingegen die Schädigung der Hepatozyten von wesentlich geringerem Ausmaß zu sein scheint (Thurman et al., 1993; Lemasters et al., 1995; Rosser & Gores, 1995; Clavien, 1998; Gao et al., 1998; Moriga et al., 2000), obwohl diese von warmer Ischämie stärker betroffen sind als sinusoidale Endothelzellen (Jaeschke, 1996). Somit nehmen die sinusoidalen Endothelzellen eine Schlüsselrolle in der Konservierungsschädigung der Leber ein.

Sinusoidale Endothelzellen (SEC) der Leber sind Teil des mikrovaskulären Endothels. Sie bilden zusammen mit anderen Zellen wie Kupfferzellen, Itozellen und Gallengangsepithelien die Gruppe der nicht-parenchymatösen Zellen der Leber und machen ungefähr 45% dieser Zellgruppe aus (Arai et al., 1999). Während die Hepatozyten für sich allein bereits ca. 78% des Gesamtvolumens der Leber ausmachen, beträgt der Anteil der nicht-parenchymatösen Zellen ungefähr 6,3% vom Gesamtvolumen; von diesem entfallen 2,8% auf die sinusoidalen Endothelzellen (Blouin et al., 1977). Sinusoidale Endothelzellen bilden ein dünnes einschichtiges Endothel ohne Basalmembran. Charakteristischerweise zeigen sie interzelluläre Öffnungen mit einem Durchmesser von ungefähr 0,2-0,6 µm und besitzen etwa 100 nm große intrazelluläre Poren für den Stofftransport, die in Clustern angeordnet sind (Siebplatten) (Arii & Imamura, 2000).

Für das Verständnis der Mechanismen der Konservierungsschädigung unabdingbar ist die Differenzierung in ihre verschiedenen Komponenten. Zum einen ist dies die hypoxisch/ischämische Komponente und zum anderen die so genannte Reperfusionsschädigung (Jaeschke, 1991; Clavien et al., 1992; Lemaster & Thurman, 1993; Lemasters et al., 1995; Jaeschke, 1996). Darüber hinaus ließ sich in vergangenen Arbeiten zeigen, dass auch die Kälte selbst als dritte Komponente wahrscheinlich entscheidend zur Konservierungsschädigung im Rahmen der Lebertransplantation beiträgt (Rauen et al., 1999; Bilzer & Gerbes, 2000; Rauen et al., 2000; Rauen & de Groot, 2002).



Während der Organentnahme und der sich anschließenden Lagerung ist das Transplantat aufgrund der aus der Trennung vom Blutkreislauf resultierenden Ischämie durch eine Hypoxie gefährdet. Die Folgen der Hypoxie sind im Wesentlichen durch ein Sistieren der mitochondrialen Atmungskette mit der konsekutiven Verarmung an intrazellulären energiereichen Phosphaten zu sehen. Diese Hypoxie wurde lange Zeit (zusammen mit der anschließenden Reoxygenierung während der Reperfusion des Organs nach dem Anschluss an den Empfängerkreislauf) als entscheidender Faktor der Konservierungsschädigung gesehen und oft auch mit dieser gleich gesetzt (Blankensteijn & Terpstra, 1991; Clavien et al., 1992; Jaeschke, 1996).

Das Modell der hypoxischen Schädigung der Leber ist wohl das bekannteste und zugleich auch das älteste Modell, welches zur Klärung der Mechanismen im Rahmen der Konservierungsschädigung herangezogen wurde und noch immer wird. Es fußt im Wesentlichen auf der durch den ATP-Mangel bedingten verminderten Aktivität ATP-abhängiger Ionentransporter und dem daraus resultierenden Anstieg der cytosolischen  $\text{Na}^+$ -Konzentration (Blankensteijn & Terpstra, 1991; Vajdová et al., 2002). Die während der Nekrose häufig beobachtete Bildung von Plasmamembranausstülpungen (so genannten Blebs) scheint dabei nicht die Folge dieser Erhöhung der cytosolischen  $\text{Na}^+$ -Konzentration, sondern vielmehr die Folge einer Beeinflussung cytoskeletaler Proteine zu sein (Rosser & Gores, 1995). In diesem Rahmen wird der Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine nicht geringe Bedeutung beigemessen, wenngleich deren Rolle letztlich nicht genau klar zu sein scheint (Blankensteijn & Terpstra, 1991). So reichen Erklärungsansätze von einer Aktivierung von Phospholipasen bis hin zur Aktivierung von nicht-lysosomalen calciumabhängigen Proteasen. Diese Proteasen sollen zum einen für den Abbau des Zytoskeletts (und damit zur Ausbildung von Blebs), zum anderen für die Umsetzung der Xanthindehydrogenase (XD) zur Xanthinoxidase (XO) verantwortlich sein. Darüber hinaus ist die Ausbildung einer intrazellulären Azidose im Rahmen der hypoxischen Leberschädigung beschrieben, die als eine Folge der Hydrolyse von ATP und der verstärkten anaeroben Glykolyse aufgefaßt wird (Lemasters et al., 1995).

Wird das Transplantat schließlich in den Empfängerkreislauf eingeschaltet, schließt sich die Phase der Reperfusion an, welche ihrerseits - wie bereits oben erwähnt - zur Konservierungsschädigung beiträgt. Die Reperfusion beinhaltet nicht nur die Reoxygenierung des Organs (auch wenn diese oft mit ihr gleichgesetzt wird), sondern auch einen inflammatorischen Prozeß. Zusätzlich zu diesen beiden Komponenten (Reoxygenierung und inflammatorischer Prozeß) gehört auch die Wiedererwärmung als dritte Komponente der Reperfusion an. Da die Wiedererwärmung jedoch erst in jüngerer Zeit als eigene schädigende Komponente im

Rahmen der Reperfusionsschädigung nach der Kaltlagerung des Organs gesehen wird, gehört sie streng genommen nicht zu den klassischen Mechanismen der Konservierungsschädigung. Auf ihre Bedeutung sei daher an dieser Stelle nur kurz hingewiesen; sie wird gegen Ende dieses und des darauf folgenden Kapitels (Kap. 1.3) im Zusammenhang mit der kälteinduzierten Apoptose nochmals aufgegriffen.

Durch das Vorhandensein von Sauerstoff während der Reperfusion des Organs und durch die Aktivität der Xanthinoxidase (s. o.) soll es nun zu einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommen mit einer sich anschließenden Peroxidation der Membranlipide (Clavien et al., 1992). Andere Arbeiten bezweifeln jedoch die der Xanthindehydrogenase respektive -oxidase im Rahmen der Reoxygenierung zugeschriebene dominierende Rolle als intrazelluläre Quelle von ROS (de Groot et al., 1989; de Groot & Brecht, 1991) und favorisieren u. a. eine mitochondriale Genese von ROS bei der Reoxygenierung (de Groot & Brecht, 1991; Jaeschke, 1996). Neben dieser Art der Bildung von ROS wird immer wieder auch die Aktivierung von Kupferzellen als entscheidende (extrazelluläre) Quelle von ROS und Interleukinen während der Reperfusionsphase diskutiert (Lemasters et al., 1995). Doch gibt es auch kontroverse Arbeiten hinsichtlich des Zeitpunktes bzw. der genauen Bedeutung der Aktivierung von Kupferzellen bei der Reperfusion der Leber (Kumamoto et al., 1999). Zusätzlich zur Bildung von ROS kommt es während der Reperfusion des Organs zu einem inflammatorischen Geschehen (s. o.) mit einer Infiltration des Gewebes durch neutrophile Granulozyten und als Konsequenz dessen zu einer Aggravation der Konservierungsschädigung des Organs (Jaeschke, 1996).

Durch den Einsatz der Hypothermie (4°C) lassen sich die durch den initialen Substrat- und Energiemangel bedingten, oben dargestellten Schädigungsmechanismen signifikant senken. Obwohl also die Kaltlagerung des Organs entscheidend für das Überleben und die Qualität des Transplantats ist, führt die Kälte selbst - wie bereits eingangs erwähnt - ebenfalls zur Schädigung (Rauen et al., 1999; Bilzer & Gerbes, 2000; Rauen et al., 2000; Rauen & de Groot, 2002). Diese beruht - nach der allgemeinen, klassischen Lehrmeinung - in erster Linie auf der Veränderung der zellulären Ionenhomöostase (Belzer & Southard, 1988; Rosser & Gores, 1995). Die kälteinduzierte verminderte Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase soll eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Gehaltes mit einem passiven Influx von  $\text{Cl}^-$  und Wasser mit der konsekutiven Entwicklung eines zellulären Ödems im Sinne der Nekrose bedingen (Belzer & Southard, 1988). Schließlich kommt es zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials. Zu den Veränderungen des Ionenmilieus gehört auch eine Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, die als Folge einer Freisetzung aus den intrazellulären Calciumspeichern (z. B. dem endoplasmatischen

Retikulum), einem transmembranösen Calciuminflux und dem Versagen der calciumaustreibenden ATPasen verstanden wird (Rosser & Gores, 1995). Hieraus soll eine Aktivierung von calciumabhängigen Proteasen, Phospholipasen und Endonucleasen resultieren (Belzer & Southard, 1988; Hochachka, 1986).

Vor diesem Hintergrund entwickelten Belzer et al. die als University of Wisconsin-Lösung (UW-Lösung) bekannte Konservierungslösung, welche im Jahre 1988 eingeführt wurde (Belzer & Southard, 1988). Ziel dieser Lösung (und auch anderer Konservierungslösungen wie der HTK-Lösung Bretschneiders) ist u. a. die Verhinderung der Entwicklung eines zellulären Ödems, welches als Folge der verminderten Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und dem daraus resultierenden Natrium- und Wassereinstrom zu verstehen ist. Diese Zellschwellung soll durch den Einsatz von impermeablen Substanzen wie Lactobionat und Hydroxyethylstärke in der UW-Lösung und Mannitol in der HTK-Lösung verhindert bzw. reduziert werden. Die während der Konservierungszeit auftretende Ischämie kann zu einer verstärkten Glykolyse bzw. Glykogenolyse mit der Gefahr einer konsekutiven Lactatbildung und schließlich einer Azidosebildung einhergehen. Um dies zu verhindern, kommt in der UW-Lösung ein Phosphatpuffer zum Einsatz, und es wurde die noch in der Collins-Lösung als osmotisch wirksame Substanz verwendete Glucose aus der UW-Lösung entfernt während in der HTK-Lösung ein Histidinpuffer Anwendung findet. Darüber hinaus enthalten die Konservierungslösungen Substrate für die Bildung energiereicher Phosphate, wie z. B. Adenosin in der UW-Lösung oder  $\alpha$ -Ketoglutarat in der HTK-Lösung. Als letztes sei noch auf den Einsatz von Antioxidantien, d. h. Glutathion und auch Allopurinol, das durch eine hemmende Wirkung auf die Xanthinoxidase die Bildung reaktiver Spezies reduzieren soll, in der UW-Lösung hingewiesen.

Neuere Arbeiten auf dem Gebiet der hepatischen Konservierungsschädigung (und hierbei insbesondere der Schädigung der Endothelzellen) berichten nun vermehrt von einem apoptotischen Zelltod, der bei der Reperfusion des Organs nach der Kaltlagerung auftritt. So zeigten sich beispielsweise während der Reperfusion des Organs nach vorausgegangener kalter Ischämie apoptotische Veränderungen der sinusoidalen Endothelzellen, die vor allem auf eine Freisetzung von ROS und proapoptotischen Substanzen wie  $\text{TNF-}\alpha$  und anderen zurückgeführt wurde (Clavien, 1998). Die Aktivierung von Kupfferzellen und Leukozyten im Sinne einer inflammatorischen Komponente sowie die Adhäsion von Thrombozyten sollten hier ebenfalls zum Zelltod beitragen. Nach bloßer Kaltischämie der Leber zeigte sich hingegen lediglich ein Abrunden der Endothelzellen, welches als eine Folge der Freisetzung von Angiogenese-Faktoren und von Proteasen, vor allem von Matrixmetalloproteasen, gewertet wurde. Moriga et al. und Gao et al. konnten ebenfalls

nachweisen, dass die reine Kaltlagerung der Leber ohne sukzessive Reperfusion nicht ausreichte, um zu einer apoptotischen Schädigung zu führen (Gao et al., 1998; Moriga et al., 2000). Das Ausmaß der Apoptose der Endothelzellen schien dabei auch abhängig von der Dauer der vorausgegangenen Kaltlagerung des Organs zu sein. Sindram et al. beschrieben einen apoptotischen Zelltod, welcher sich ebenfalls nur bei der Wiedererwärmung des Organs manifestierte und der ausschließlich die Endothelzellen betraf (vermutlich über eine Aktivierung von Calpainen), wohingegen die Hepatozyten einem nekrotischen Zelltod erlagen (Sindram et al., 1999). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Natori et al., die ebenfalls eine Apoptose der Endothelzellen nur während der Reperfusion beobachten konnten. Allerdings wurde hier nicht eine Aktivierung von Calpainen als Ursache, sondern eine Aktivierung von Caspasen diskutiert (Natori et al., 1999). Im Gegensatz zu den vorangestellten Arbeiten konnten Rentsch et al. auch nach reiner Kaltinkubation der Leber eine Apoptose sowohl der Endothelzellen als auch der Hepatozyten beobachten, die postulierte Aktivierung von Caspasen konnten sie jedoch nur bei der Reperfusion des Organs nachweisen (Rentsch et al., 2001).

Ein apoptotischer Zelltod der Endothelzellen nach Kaltlagerung und nachfolgender Reperfusion des Organs ließ sich jedoch nicht nur am Gesamtorgan nachweisen, sondern auch im Zellkulturmodell. So konnten Moriga et al. zeigen, dass es nach Kaltinkubation kultivierter sinusoidaler Endothelzellen in der UW-Lösung und anschließender Wiedererwärmung im Zellkulturmedium ebenfalls zur Apoptose kam (Moriga et al., 2000). Moriga et al. führten die Zellschädigung jedoch nicht auf einen Auslöser zurück und sprachen stattdessen ganz allgemein von einer apoptotischen Konservierungsschädigung. Rauen et al. konnten jedoch eindeutig zeigen, dass die Zellschädigung nach Kaltlagerung und Wiedererwärmung von kultivierten sinusoidalen Endothelzellen auf die Kälte selbst zurückzuführen ist (Rauen et al., 1999; Kerkweg et al., 2002) und beschrieben diese Zellschädigung als kälteinduzierte Apoptose.

### 1.3 Kälteinduzierte Apoptose

Wie oben bereits beschrieben, führt die Kälte selbst zu einer Zellschädigung. Im Gegensatz zur klassischen Theorie der kälteinduzierten Leberzellschädigung, die sich als eine Form des nekrotischen Zelltodes darstellt (s. o.), konnten Rauen et al. zeigen, dass bei kultivierten Rattenleberendothelzellen die bloße Sequenz Hypothermie (4°C)/Wiedererwärmung (37°C) zu einer ausgeprägten Zellschädigung führt, die sich bei Wiedererwärmung der Zellen als apoptotischer Zelltod manifestiert (Rauen et al., 1999).

Beim apoptotischen Zelltod (auch programmierter Zelltod genannt) handelt es sich im Gegensatz zur Nekrose um einen aktiven Prozess, dessen Definition sich vor allem nach zellmorphologischen Kriterien richtet (Kroemer et al., 1995; Patel & Gores, 1998). Die Apoptose zeichnet sich u. a. durch eine Zellschrumpfung, Kernfragmentation und der Entwicklung organellhaltiger zytoplasmatischer Ausstülpungen und Abschnürungen (so genannter apoptotic bodies) aus. Das Vorliegen einer DNA-Fragmentation - wie oft zitiert - mit Fragmenten von ca. 180 bp ist hingegen nicht zwingend für die Zuordnung eines Zelltodes zur apoptotischen Form. Apoptose als ein fundamentaler Prozess, sowohl in physiologischer als auch pathologischer Hinsicht, verläuft aufgrund der erhalten gebliebenen Integrität der Zellmembran ohne eine Begleitreaktion des umgebenden Gewebes im Sinne einer Entzündung ab. Dennoch kann es auch, hier v. a. in Zellkultur, im weiteren Verlauf zur Entwicklung einer sekundären Nekrose mit einer erhöhten Permeabilität der Plasmamembran kommen (Gao et al., 1998; Saraste, 1999).

Das Ausmaß der oben zitierten kälteinduzierten Apoptose steht in direktem Zusammenhang mit der Dauer der Kaltinkubation der Zellen (Rauen et al., 1999). Die kälteinduzierte Apoptose tritt nicht nur nach der Kaltinkubation und der sich anschließenden Wiedererwärmung sinusoidaler Endothelzellen auf, sondern auch bei so verschiedenen Zelltypen wie Hepatozyten und Nierentubuluszellen und scheint somit ein verbreitetes Phänomen zu sein, wenngleich sie auch nicht gänzlich unabhängig vom Zelltyp ist (Rauen et al., 1999; Salahudeen et al., 2001; Vairetti et al., 2001; Rauen et al., 2003). Die kälteinduzierte Apoptose lässt sich nach Kaltinkubation der Zellen in unterschiedlichen Inkubationsmedien nachweisen. So zeigen Endothelzellen sowohl nach der Kaltinkubation in Zellkulturmedium als auch in Krebs-Henseleit-Puffer eine kälteinduzierte Apoptose (Rauen et al., 1999). Auch in UW-Lösung, ursprünglich entwickelt, um die Kälteschädigung im Sinne der klassischen Theorie zu reduzieren (s. o.), zeigt sich eine kälteinduzierte Apoptose (Kerkweg et al., 2002). Diese wird - verglichen mit der nach Kaltinkubation im Zellkulturmedium bzw.

Krebs-Henseleit-Puffer auftretenden kälteinduzierten Apoptose - über einen bisher unbekannten Mechanismus sogar noch verstärkt.

Anders als bei der klassischen Theorie der Kälteschädigung spielt eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration bei der kälteinduzierten Apoptose keine Rolle. Im Gegenteil, nach der Kaltinkubation von Leberendothelzellen zeigte sich ein Abfall der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration (Gizewski et al., 1997; Fuckert et al., 2000). Von entscheidender Bedeutung für die kälteinduzierte Apoptose der Leberendothelzellen ist vielmehr eine durch ROS vermittelte Zellschädigung. Hierbei kommt es jedoch nicht zu einer messbaren Erhöhung der primären ROS selbst ( $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$ ), sondern vielmehr zu einer ausgeprägten Erhöhung des chelatisierbaren („redox-aktiven“) Eisenpools (Rauen et al., 1999; Rauen et al., 2000; Kerkweg et al., 2002; Rauen & de Groot, 2002). Unter diesem Pool/Begriff versteht man jenes, zumeist zweiwertige, Eisen, welches nicht fest an Proteine (wie z. B. Ferritin oder Funktionsproteine wie Hämproteine), sondern an niedermolekulare Chelatoren (wie z. B. Citrat, Phosphat, ATP) gebunden bzw. locker an Proteine assoziiert ist (Petrat et al., 1999). Über diesen Anstieg des redox-aktiven Eisenpools, der für die kälteinduzierte Apoptose von grundlegender Bedeutung ist, kann es zur Bildung des sehr schädlichen Hydroxylradikals kommen. Dieses und auch andere Formen von ROS führen vermutlich zur so genannten „Mitochondrial Permeability Transition“ (mitochondrialer Permeabilitätsübergang, MPT), die sich während der Wiedererwärmung der Zellen nach vorausgegangener Kaltinkubation der Zellen nachweisen läßt (Kerkweg et al., 2003; Rauen et al., 2003). Der mit der MPT einhergehende Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials während der Wiedererwärmung der Zellen ist von entscheidender Bedeutung für die kälteinduzierte Apoptose. So ließ sich durch den Einsatz der für Leberzellen effektivsten MPT-Inhibitoren Trifluorperazin und Fruktose die kälteinduzierte Apoptose signifikant senken. Da das Auftreten der MPT eisenabhängig erfolgt, ließ sich diese (und dadurch letztlich auch die kälteinduzierte Apoptose der Endothelzellen) durch den Einsatz von Eisenchelatoren nahezu komplett hemmen.

Aufgrund der oben geschilderten eisenkatalysierten Bildung/Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und der damit einhergehenden zytotoxischen Effekte (MPT und Peroxidation von Lipiden) fällt also dem chelatisierbaren Eisenpool eine entscheidende Rolle im Rahmen der kälteinduzierten Apoptose zu, die als eine direkte Folge der Erhöhung des chelatisierbaren Eisenpools anzusehen ist.

## 1.4 Proteasen und ihre Beteiligung an apoptotischen Prozessen

Unter dem Begriff der Proteasen versteht man ganz allgemein jene Gruppe von Enzymen, deren Charakteristikum die Spaltung von Proteinen an für sie jeweils typischer Stelle innerhalb der Primärstruktur des Proteins ist. Abhängig davon, ob das Protein am N'- bzw. C'-terminalen Ende oder in einem zwischen den beiden Enden gelegenen Bereich gespalten wird, bezeichnet man sie als Exo- bzw. Endoproteasen. Die Nomenklatur der Endoproteasen richtet sich in der Regel nach der vorherrschenden Aminosäure innerhalb des katalytischen Zentrums. So lassen sich u. a. Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen (so benannt wegen des notwendigen Vorhandenseins von Metallionen wie  $\text{Zn}^{2+}$ ) abgrenzen.

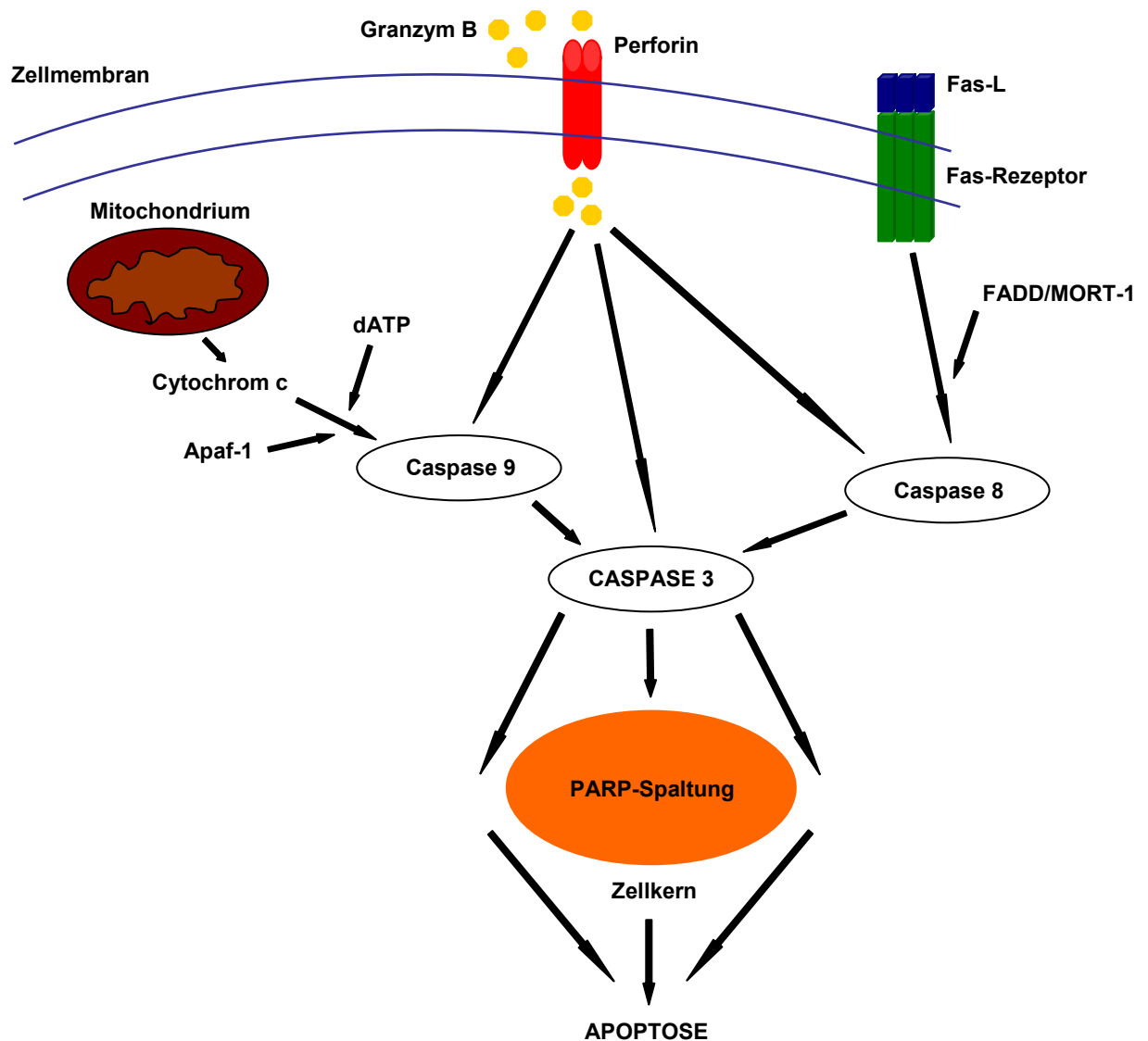
Einigen dieser Endoproteasen, die je nach Typ intrazellulär oder auch extrazellulär zu finden sind, wird entscheidende Bedeutung für die Apoptose in verschiedenen Apoptosemodellen beigemessen (Patel et al., 1996; Solary et al., 1998; Johnson, 2000; Kidd et al., 2000). Die den Proteasen zukommende Funktion innerhalb des Zelltodes unterscheidet sich jedoch teilweise erheblich.

Die zweifellos bekanntesten und am häufigsten bei apoptotischen Prozessen diskutierten Proteasen sind die Caspasen, die zur Gruppe der Cysteinproteasen zählen. Ihnen wird in unzähligen Arbeiten eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Miller, 1997; Fadeel et al., 2000). Diese fußte ursprünglich auf ersten Beobachtungen über die elementare Bedeutung der Caspasen, damals noch als Interleukin-1 $\beta$ -Convertierende Enzyme (ICE) bezeichnet, im Rahmen des physiologischen Zellunterganges während der Entwicklung des Nematoden *C. elegans*. In den folgenden Jahren wurde der Begriff der ICE zunehmend durch den neuen, noch heute gültigen Begriff, der Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische-Proteasen, wobei „Aspartat“ sich auf die Eigenschaft der Caspasen bezieht, jeweils nach einem Aspartatrest das Protein zu spalten) ersetzt (Fadeel et al., 2000; Kidd et al., 2000). Die Funktionen und Aufgaben der einzelnen Caspasen (mindestens 14 Unterformen sind gegenwärtig bekannt) sind sehr unterschiedlich. So sollen nur die Subtypen 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12 und 13 an apoptotischen Mechanismen beteiligt sein (Faubion et al., 1999). Diese Caspasen lassen sich zudem noch in so genannte Initiatorcaspasen (Typen 2, 8, 9 und 10) und Effektorcaspasen (vor allem Caspase 3) unterteilen. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt letztlich über den Mechanismus einer limitierten Proteolyse, d. h. die Initiatorcaspasen liegen als Zymogene bzw. inaktive Pro-caspasen vor, die durch Abspaltung einer Domäne aktiviert werden (Fadeel et al., 2000). Über die Initiatorcaspasen kommt es schließlich zu einer Aktivierung der Effektorcaspasen wie z. B. Caspase 7 oder 3. Diese bewirken eine intrazelluläre Proteolyse zahlreicher

Substrate wie z. B. der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) oder dem Fodrin, einem Bestandteil des Zytoskeletts (Qin et al., 2001). Spätestens mit dieser Aktivierung der Effektorcaspasen überschreitet die Zelle den so genannten „point of no return“, und es resultiert der apoptotische Zelltod.

Die Aktivierung der Caspasen wie z. B. von Caspase 8 kann hierbei durch wenigstens drei differente Mechanismen erfolgen. Zum einen soll die Bindung von Liganden (z. B. von Fas-L) an Membranrezeptoren wie dem so genannten Fas-Rezeptor (früher auch als CD-95 bzw. APO-1 bezeichnet), ein transmembranäres Protein aus der Gruppe der TNF-Rezeptorfamilie (Patel & Gores, 1998), zu einer Rekrutierung des Adapterproteins FADD/MORT1 führen. Hiernach kommt es zu einer Konformationsänderung der Procaspase 8 mit konsekutiver autoproteolytischer Spaltung von Procaspase 8 und einer sukzessiven Aktivierung von Caspase 3 (Solary et al., 1998). Ein anderer Weg der Caspaseaktivierung führt über eine Freisetzung von extrazellulären Proteasen wie z. B. dem Granzym B, einer durch Exozytose aus aktivierten T-Lymphozyten freigesetzten Serinprotease. Granzym B dringt, nach vorausgegangener Sekretion von Perforin und konsekutiver Perforation der Zellmembran, in die Zielzelle und führt dort zu einer Aktivierung der Procaspasen. Teilweise soll Granzym B aber auch in der Lage sein, direkt Procaspase 3 zu Caspase 3 zu aktivieren (Patel et al., 1996; Schutte & Ramaekers, 2000). Der dritte und zugleich mit Abstand am häufigsten diskutierte Weg zur Aktivierung der Caspasen verläuft über eine mitochondriale Schädigung als zentralem Punkt der apoptotischen Kaskade (Kidd et al., 2000; Schutte & Ramaekers, 2000). Nach Einfluß eines schädigenden Agens kommt es u. a. zur Öffnung eines (hypothetischen) Kanals zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran, der so genannten „Mitochondrial Permeability Transition“ (dem mitochondrialen Permeabilitätsübergang, MPT), mit konsekutivem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials. Als Folge der MPT kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c - und anderen Substanzen wie dem Apoptose-induzierenden-Faktor (AIF) - aus dem Mitochondrium in das Cytosol. Cytochrom c seinerseits führt über eine Bindung an Apaf-1 (Apoptotic-protease-activating-factor) und dATP zur Aktivierung von Caspase 9 und letztlich zur Aktivierung von Caspase 3.





**Abb. 1. Mechanismen der Caspaseaktivierung.** Dargestellt sind die drei wichtigsten Wege der Caspaseaktivierung: Die Aktivierung über Membranrezeptoren wie z. B. Fas, die Granzym B vermittelte Aktivierung und vor allem die mitochondriale Aktivierung über eine Freisetzung von Cytochrom c. Einzelheiten im Text.

Neben Caspasen gehören auch die Calpaine zu den Cysteinproteasen. Diese calciumabhängigen, cytosolischen Proteasen werden nach der für ihre Aktivierung benötigten Höhe der Calciumkonzentration in Calpain I (benötigt  $\text{Ca}^{2+}$  in mikromolarer Konzentration) und Calpain II (benötigt  $\text{Ca}^{2+}$  in millimolarer Konzentration) eingeteilt. Wenngleich auch ihre Bedeutung kontroverser diskutiert wird als die Bedeutung der Caspasen, so gibt es doch genügend Hinweise auf eine Beteiligung von Calpainen am apoptotischen Zelltod in verschiedenen Modellen (Squier et al., 1994; Carafoli & Molinari, 1998). So soll die Calpainaktivierung über eine Erhöhung des intrazellulären Calciums respektive eine Inaktivierung von Calpastatin, dem physiologischen

Calpaininhibitor, zu einer Degradation cytoskeletaler Proteine (z. B. Fodrin), Membranproteinen (z. B. Calcium-ATPase) und cytosolischer Proteine, die unter bestimmten Bedingungen membranassoziiert sind (z. B. Proteinkinase C), führen.

Während es eine Fülle von Arbeiten gibt, die eine Beteiligung von Caspasen und Calpainen an apoptotischen Prozessen favorisieren (s. o.), gibt es vergleichsweise weniger Arbeiten hinsichtlich einer Beteiligung von anderen Proteasen. In einzelnen Apoptosemodellen werden jedoch auch das Cathepsin B, ebenfalls eine Cysteinprotease (Faubion et al., 1999; Johnson, 2000), unterschiedliche Serinproteasen (Weaver et al., 1993; Wright et al., 1994; Hughes et al., 1998; Dong et al., 2000) sowie in einer inzwischen höheren Zahl von Arbeiten das Proteasom (Grimm et al., 1996; Shinohara et al., 1996; Hirsch et al., 1998; Naujokat et al., 2000; Qiu et al., 2000; Wagenknecht et al., 2000; Fan et al., 2001) diskutiert. Die Bedeutung dieser Proteasen innerhalb der Apoptosekaskade ist jedoch - außer in einzelnen Modellen - noch weitgehend unklar.

## **1.5 Beteiligung von Proteasen an der Konservierungsschädigung der Leber**

Während der letzten zehn Jahre haben Befunde über eine Beteiligung von Proteasen an der Konservierungsschädigung der Leber zugenommen. Die meisten Befunde hierzu deuten auf eine Beteiligung von Calpainen als Schlüsselfaktoren dieser speziellen Form der Gewebeschädigung hin (Kohli et al., 1997; Sindram et al., 1999). In diesen Arbeiten ließ sich die erhöhte Calpainaktivität sowohl am Ende der kalten Ischämie als auch während der Reperfusion des Organs eindeutig nachweisen. Das Ausmaß der Calpainaktivierung war dabei jeweils abhängig von der Dauer der Ischämie bzw. Reperfusion. Die Autoren führten die Calpainaktivierung vornehmlich auf eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zurück, schlossen aber eine mögliche Aktivierung über Caspasen (durch Spaltung des physiologischen Inhibitors Calpastatin) und Phospholipasen nicht aus.

Darüber hinaus gibt es auch einzelne Befunde hinsichtlich einer Beteiligung von Matrixmetalloproteasen (MMP) (Upadhya et al., 1997; Upadhya & Strasberg, 1999). Die Autoren konnten eine deutliche, signifikant erhöhte MMP-Aktivität nach der Kaltexposition der Leber bzw. kultivierter sinusoidaler Endothelzellen in der EuroCollins-Konservierungslösung zeigen. Nach Kaltinkubation in der UW-Lösung hingegen ließ sich eine erhöhte MMP-Aktivität praktisch nicht zeigen. Dies ist nicht überraschend, da der Einsatz von Lactobionat (einem Bestandteil der UW-Lösung, s. auch Kap. 3.2) ebenfalls die MMP-Aktivität signifikant zu senken vermochte. Die MMP-Aktivierung nach Hypothermie des Gesamtorganes Leber wurde in diesen Arbeiten der während der Kaltlagerung auftretenden Aktindissoziation zugeschrieben. Unklar blieb jedoch, ob die nachgewiesene erhöhte MMP-Aktivität wirklich entscheidend zum Zelltod beiträgt oder ob es sich nur um ein Epiphänomen handelt, weil keine Aussage hinsichtlich der Vitalität der Zellen - beispielsweise unter Einsatz von MMP-Inhibitoren - gemacht wurde. Auch war letztlich nicht klar, ob es sich nun um einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod handelte.

Obwohl es eine Unzahl von Arbeiten gibt, die eine Beteiligung von Caspasen an der Apoptose in den verschiedensten Modellen der Apoptose beschreiben (s. o.), stehen diesen gegenwärtig nur zwei Arbeiten gegenüber, die eine Beteiligung von Caspasen bei der speziellen Form der hepatischen Konservierungsschädigung beschreiben (Natori et al., 1999; Rentsch et al., 2001). Beide Arbeitsgruppen beobachteten eine Aktivierung von Caspasen, genauer gesagt der Caspase 3, nur bei der sich anschließenden Reperfusion des Organs. Die Caspase 3-Aktivierung soll als mögliche Folge einer während der Reperfusion auftretenden oxidativen Schädigung der Mitochondrien mit Verlust ihres Membranpotentials und einer konsekutiven

Freisetzung von Cytochrom c vonstatten gehen. Die Caspasen ihrerseits sollen schließlich u. a. über eine Aktivierung von Calpainen zur Zellschädigung führen. Auch wenn die Autoren durch den Einsatz von Caspaseinhibitoren das Ausmaß der Endothelzellschädigung zu senken vermochten, so ließ sich das Überleben der Ratten nach Transplantation nur geringfügig um einige Stunden verlängern.

Zudem gibt es eine - wenngleich auch ältere - Arbeit über eine Beteiligung von Aspartatproteasen (Ferguson et al., 1993). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass es sowohl nach kalter als auch nach warmer Ischämie der Gesamtleber zu einer Aktivierung von Aspartatproteasen kam, wobei die nach warmer Ischämie gemessene Aspartatproteaseaktivität durchweg höher war. Auch isolierte Hepatozyten in Suspension wiesen unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Aspartatproteaseaktivität auf. Ob Aspartatproteasen jedoch eine signifikante Beteiligung am (damals noch nicht als apoptotisch bezeichneten) Zelltod haben, blieb unklar, denn es wurden einerseits keine Untersuchungen zur Vitalität der Zellen durchgeführt und andererseits wurde(n) die Protease(n) nicht näher identifiziert.

Auf eine Beteiligung von Serinproteasen oder Cathepsinen an der Konservierungsschädigung der Leber gibt es derzeit hingegen überhaupt keine Hinweise in der Literatur. Auch das Proteasom, dem im Zellstoffwechsel der Proteine entscheidende Bedeutung beikommt und dessen Aktivierung beim apoptotischen Zelltod in verschiedenen Modellen gezeigt werden konnte (s. o.), findet im Rahmen der Konservierungsschädigung der Leber bisher keinerlei Beachtung. Gibt es also nur einige wenige Hinweise auf eine Beteiligung von Proteasen an der Konservierungsschädigung der Leber, so ist gegenwärtig in der Literatur keine einzige Arbeit bekannt, die über eine Beteiligung von Proteasen an der kälteinduzierten Apoptose von Leberzellen berichtet.

## **2. Fragestellung**

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob an der kälteinduzierten Apoptose kultivierter sinusoidaler Rattenleberendothelzellen Proteasen beteiligt sind und, falls ja, welche Proteasen beteiligt sind.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

RPMI 1640-Zellkulturmedium, Gentamicin und Penicillin/Streptomycin wurden von Gibco (Eggenstein, Deutschland) bezogen. Triton X-100, Dimethylsulfoxid (DMSO), Tris, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) wurden bei Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben. Fetales Kälberserum, Tosyl-phenylalanin-chloromethylketon (TPCK), 4-Hydroxycumarin, 1,10-Phenanthrolin, Cbz-Val-Phe-methylester, Pepstatin A, Aprotinin, Leupeptin, CA-074, Suc-Leu-Tyr-AMC, N-t-Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC und 7-Amido-4-methylcumarin (AMC) waren von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland). Die Farbstoffe Hoechst 33342 (H33342) und Propidiumjodid wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Kollagen R wurde über Serva (Heidelberg, Deutschland) angeschafft. Lactacystin, Ac-DEVD-AMC und z-Leu-Leu-Glu-AMC wurden bei Alexis (Grünberg, Deutschland) erworben, und Deferoxamin (Desferal) war von Novartis Pharma (Nürnberg, Deutschland). Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Suc-Ala-Ala-Ala-AMC, z-Arg-Arg-AMC und Tosyl-lysine-chloromethylketon (TLCK) wurden von Bachem (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Calpeptin, 3,4-Dichloroisocumarin (DCI), z-VAD.fmk, z-DEVD.fmk und MG-132 waren von Calbiochem (Schwalbach, Deutschland), und  $\alpha_2$ -Makroglobulin war von Roche (Mannheim, Deutschland). Der Anti-20S-Proteasom Antikörper wurde über Affinity (Exeter, GB) angeschafft und Protein A Sepharose CL-4B wurde bei Amersham (Buckinghamshire, GB) erworben.

Die UW-Lösung, freundlicherweise von DuPont (Bad Homburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt, wurde mit 200.000 U/l Benzylpenicillin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 40 U/l Insulin (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 16 mg/l Dexamethason (Serva, Heidelberg, Deutschland) versetzt. Die HTK-Lösung wurde freundlicherweise von Köhler (Alsbach-Hähnlein, Deutschland) bereitgestellt.

### 3.2 Zusammensetzung der Konservierungslösungen HTK und UW

**Tab. 1. Zusammensetzung der Konservierungslösungen Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK) und University of Wisconsin (UW).** Der UW-Lösung wurden jeweils vor Versuchsbeginn 16 mg/l Dexamethason, 40 IU/l Insulin und 200.000 IU/l Penicillin frisch zugegeben.

Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat- (HTK)-Lösung		University of Wisconsin- (UW)-Lösung	
NaCl	15 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mM
KCl	9 mM	K-Lactobionat	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	4 mM	MgSO <sub>4</sub>	5 mM
Mannitol	30 mM	Glutathion	3 mM
Histidin	180 mM	Raffinose	30 mM
Histidinhydrochlorid	18 mM	Allopurinol	1 mM
Tryptophan	2 mM	Adenosin	5 mM
K-Ketoglutarat	1 mM	Hydroxyethylstärke	5%
		Penicillin	200.000 IU/l
		Insulin	40 IU/l
		Dexamethason	16 mg/l
pH	7,2	pH	7,4
Osmolarität	300 mosm/l	Osmolarität	325 mosm/l

### 3.3 Zellkultur

Für alle Experimente wurden zwei Zelllinien sinusoidaler Rattenleberendothelzellen verwendet. Die Zellen entstammten männlichen Wistar-Ratten (200-240 g), die freien Zugang zu Wasser und Nahrung hatten (Bezug über das zentrale Tierlabor des Universitätsklinikums Essen). Die Zellen waren, wie bereits von Rauen et al. beschrieben (Rauen et al., 1993), isoliert worden: nach in-situ-Perfusion der Leber mit Kollagenase waren die Hepatozyten durch eine Differentialzentrifugation aus der Zellsuspension entfernt worden. Aus der übrig bleibenden Zellsuspension

nicht-parenchymaler Zellen waren die Endothelzellen durch selektive Adhärenz getrennt worden. Die kultivierten Zellen waren sowohl durch die elektronenmikroskopische Demonstration der so genannten Siebplatten, als auch durch den immunologischen Nachweis des von Willebrand-Faktors eindeutig als sinusoidale Endothelzellen identifiziert worden. Die Zellen wurden - wie bereits zuvor von Rauen et al. beschrieben (Rauen et al., 1993) - in RPMI 1640-Zellkulturmedium kultiviert. Das Medium wurde am Tag nach dem Beimpfen der Zellkulturflaschen/Glasplättchen bzw. alle 2-3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden am siebten Tag im konfluenten Zustand verwendet.

### **3.4 Experimentelles Vorgehen**

Zu Versuchsbeginn wurden die Endothelzellen dreimal mit Hanks' balanced salt solution (HBSS, 37°C) gewaschen. Anschließend wurden sie jeweils mit Zellkulturmedium (37°C), UW-Lösung (4°C) oder HTK-Lösung (4°C) bedeckt und bei 4°C (alle Lösungen) bzw. bei 37°C (nur Zellkulturmedium; warme Kontrollen) inkubiert. Die Inkubation der mit (bicarbonatgepuffertem) Zellkulturmedium bedeckten Zellen erfolgte in einer aus 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> bestehenden, wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Jene Zellen, die in UW-Lösung (phosphatgepuffert) bzw. HTK-Lösung (histidingepuffert) inkubiert wurden, waren hingegen normaler Raumluft ausgesetzt. Einige Zellen wurden vor der Kaltinkubation mit dem Eisenchelator Desferal vorinkubiert (10 mM im Zellkulturmedium, 30 min, 37°C). DCI (500 µM), TLCK (100 µM), TPCK (100 µM),  $\alpha_2$ -Makroglobulin (100 µg/ml), Aprotinin (20 µg/ml), Pepstatin A (10 µg/ml) und z-FA.fmk (100 µM) wurden den Inkubationsmedien unmittelbar vor der Kaltinkubation zugefügt. Die Proteaseinhibitoren z-DEVD.fmk (100 µM), z-VAD.fmk (100 µM), PMSF (4 mM), Cbz-Val-Phe-methylester (100 µM) und CA-074 (10 µM) wurden den Konservierungslösungen HTK und UW hinzugefügt, nachdem die Zellen für eine Stunde bzw. 10 min (CA-074) im Zellkulturmedium bei 37°C mit der jeweiligen Substanz vorinkubiert worden waren.

Nach 24 h (falls nicht anders angegeben) Kaltinkubation wurden die Zellen bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre (95% Luft und 5% CO<sub>2</sub>) wiedererwärmt. Bei den in den Konservierungslösungen inkubierten Zellen wurde zuvor das entsprechende Medium entfernt, die Zellen mit kaltem HBSS (4°C) gewaschen und Zellkulturmedium (4°C) hinzugefügt.



### 3.5 Übersicht über die verwendeten Hemmstoffe

**Tab. 2. Zusammenstellung der in den Untersuchungen zur Beurteilung der Zellvitalität verwendeten Inhibitoren.** Die Inhibitoren Aprotinin, 3,4-Dichloroisocumarin (DCI),  $\alpha_2$ -Makroglobulin, Pepstatin A, Tosyl-Lysin-Chloromethylketon (TLCK) und Tosyl-Phenylalanin-Chloromethylketon (TPCK) wurden den Endothelzellen unmittelbar vor der Kaltinkubation im entsprechenden Medium hinzugefügt. Die Inhibitoren CA-074, Cbz-Val-Phe-Methylester, z-DEVD.fmk, z-FA.fmk, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und z-VAD.fmk wurden den Endothelzellen zunächst als Vorinkubation in Zellkulturmedium (37°C) zugefügt, danach erfolgte eine erneute Zugabe vor der Kaltinkubation im entsprechenden Medium. Desferal wurde den Endothelzellen nur als Vorinkubation in Zellkulturmedium (37°C) hinzugegeben ohne eine erneute Zufuhr vor der Kaltinkubation im entsprechenden Medium. Desferal wurde eingesetzt, um den (proteaseunabhängigen) kälteinduzierten Anstieg des chelatisierbaren Eisens zu inhibieren. Desferal kann jedoch als Eisenchelator auch eine Hemmung der Aktivierung von Matrixmetalloproteasen (MMP) bewirken (s. auch Kap. 4.2.3).

	Endkonzentration	Lösungsmittel	Vorinkubation	Zugabe vor Kaltinkubation	hemmt
<b>Desferal</b>	10 mM	A. bidest	30 min	nein	(teilweise auch MMP)
<b>Aprotinin</b>	20 µg/ml	A. bidest	nein	ja	Serinproteasen
<b>DCI</b>	500 µM	DMSO	nein	ja	Serinproteasen
<b><math>\alpha_2</math>-Makroglobulin</b>	100 µg/ml	A. bidest	nein	ja	MMP
<b>Pepstatin A</b>	10 µg/ml	Ethanol	nein	ja	Aspartatproteasen
<b>TLCK</b>	100 µM	A. bidest	nein	ja	Serinproteasen
<b>TPCK</b>	100 µM	A. bidest	nein	ja	Serinproteasen
<b>CA-074</b>	100 µM	DMSO	10 min	ja	Cathepsin B
<b>Cbz-Val-Phe-Methylester</b>	100 µM	DMSO	1 h	ja	Calpaine
<b>z-DEVD.fmk</b>	100 µM	DMSO	1 h	ja	Caspase 3
<b>z-FA.fmk</b>	100 µM	DMSO	1 h	ja	Cathepsin B
<b>PMSF</b>	4 mM	DMSO	1 h	ja	Serinproteasen
<b>z-VAD.fmk</b>	100 µM	DMSO	1 h	ja	Caspasen

### 3.6 Beurteilung der Zellschädigung

Die Morphologie der Endothelzellen wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops des Typs Zeiss IM-35-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) beurteilt. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, vorbereitet und anschließend kalt inkubiert (4°C). Die Kaltinkubation wurde nach 24 Stunden beendet; einige Zellen wurden anschließend für zwei weitere Stunden im Zellkulturmedium wiedererwärmt (37°C). Als Kontrolle galten unbehandelte, bei 37°C inkubierte Endothelzellen.

Die Kerne der auf Glasplättchen kultivierten Endothelzellen wurden zu den gegebenen Zeitpunkten mit den DNA-bindenden Farbstoffen H33342 (membranpermeabel) und Propidiumjodid (nicht membranpermeabel) angefärbt (Rauen et al., 1999). Dazu wurde das normale Zellkulturmedium durch Zellkulturmedium, welches nur noch 5% fetales Kälberserum enthielt, ersetzt, der Farbstoff H33342 wurde dem Überstand (Zellkulturmedium bzw. HTK-Lösung) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugefügt, und die Zellen wurden für 12 min bei einer Temperatur von 37°C bzw. für 20 min bei 4°C inkubiert. Zwei Minuten vor dem Ende der Inkubation mit H33342 (Inkubation bei 37°C) bzw. fünf Minuten vor dem Ende der Inkubation mit diesem Fluorophor (Inkubation bei 4°C) wurde Propidiumjodid in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zugefügt und der Überstand vorsichtig durchmischt. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen sofort unter einem Zeiss Axiovert 135 TV Mikroskop, ausgestattet mit einer Epifluoreszenzoptik (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), beurteilt. Die Inkubationstemperaturen von 4°C bzw. 37°C wurden über den Messzeitraum konstant gehalten. Die Farbstoffe wurden mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc.}} = 380 \pm 10 \text{ nm}$  angeregt. Die Emissionswellenlänge betrug  $\lambda_{\text{em.}} \geq 520 \text{ nm}$ . Die Kernfärbung und -morphologie wurden optisch beurteilt und digitalfotografisch dokumentiert.

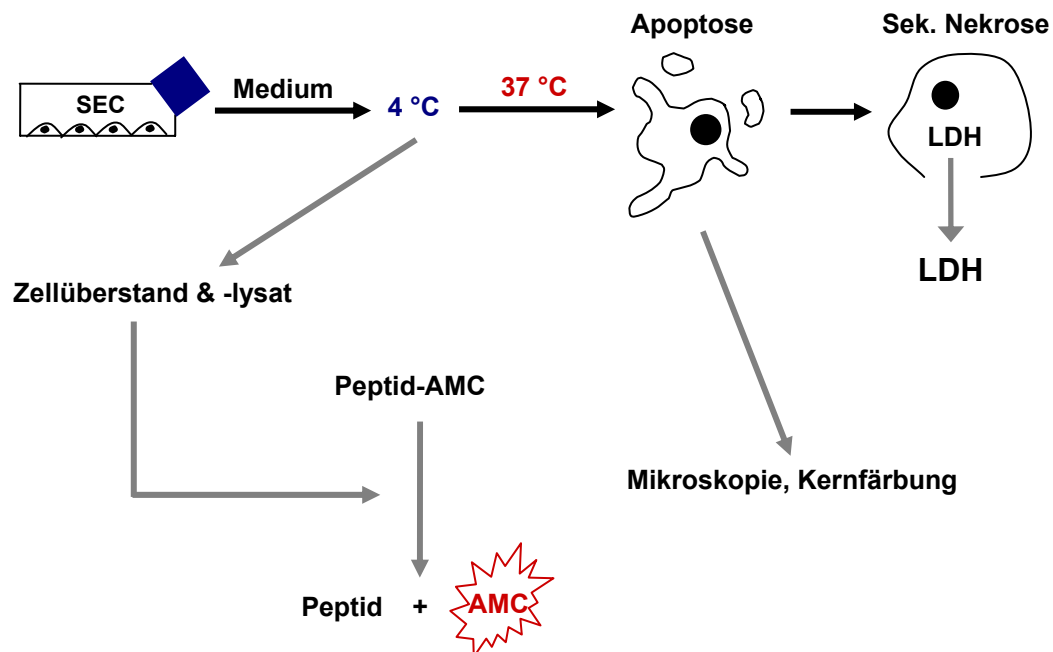
Da es auch im Rahmen der kälteinduzierten Apoptose sekundär zu der Ausbildung einer Nekrose mit Erhöhung der Permeabilität der Plasmamembran kommt, lässt sich durch die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH) indirekt auf das Ausmaß der Zellschädigung schließen. Zur Bestimmung der freigesetzten (extrazellulären) LDH-Aktivitäten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben des Inkubationsmediums entnommen. Nach Beendigung der Inkubation wurde die intrazellulär verbliebene LDH durch Lyse der Zellen mit dem Detergenz Triton X-100 (1% in HBSS) freigesetzt. Die Messung der LDH-Aktivität (nach einem Assay von Bergmeyer, 1974) erfolgte mit Hilfe eines automatischen Spektrallinienphotometers (ACP 5040, Eppendorf, Hamburg). Die Enzymaktivität wurde hierbei an Hand der

photometrisch (bei einer Wellenlänge von 334 nm) unterscheidbaren Umsetzungsgeschwindigkeit des Coenzym NADH in seine oxidierte Form  $\text{NAD}^+$  bestimmt (Messpuffer bestehend aus 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, NADH 0,14 mM und Pyruvat 0,6 mM). Die Zellschädigung wurde als Prozentsatz der (extrazellulären) LDH-Aktivitäten von der Gesamtaktivität angeben.

### 3.7 Bestimmung der Proteaseaktivitäten

#### 3.7.1 Allgemeines Prozedere

Der Nachweis von Proteaseaktivitäten lässt sich durch die Spaltung fluoreszenzmarkierter Proteasesubstrate erbringen. Als Fluorophor diente hierbei 7-Amido-4-methylcumarin (AMC), das in freier, nicht peptidgebundener Form fluoresziert. Die Spezifität der einzelnen Substrate für unterschiedliche Proteasen ist durch die Art und Zahl der einzelnen Aminosäuren des Peptids bedingt.



**Abb. 2. Prinzip der Messung von Proteaseaktivitäten.** Sinusoidale Endothelzellen (SEC) zeigen nach Kaltinkubation in verschiedenen Medien (z. B. University of Wisconsin-Lösung [UW] oder Zellkulturmedium) und anschließender Wiedererwärmung (37°C) eine kälteinduzierte Apoptose mit typischen morphologischen Veränderungen. Diese entwickelt sich im weiteren Verlauf zu einer sekundären Nekrose mit erhöhter Permeabilität der Plasmamembran und einem konsekutiven Austritt cytosolischer Komponenten (hier am Beispiel der Lactatdehydrogenase [LDH] dargestellt). Um die Proteaseaktivität zu messen, wurde nach der Kaltinkubation der SEC der Zellüberstand entnommen, und

die Zellen wurden lysiert. Sowohl Zellüberstand als auch -lysat wurden mit einem Fluoreszenzsubstrat bestehend aus einer Peptidsequenz und einem Aminomethylcumarin (AMC) (z. B. Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, 50  $\mu$ M) in jeweils getrennten Ansätzen unter standardisierten Bedingungen inkubiert. Zu einem messbaren Anstieg des Fluoreszenzsignals kommt es nur dann, wenn es - bedingt durch eine proteolytische Aktivität - zu einer Abspaltung und Freisetzung des AMC von der Peptidsequenz kommt, da nur das freie, nicht gebundene AMC fluoresziert. Somit ist der durch die Spaltung des Fluoreszenzsubstrates bedingte Anstieg des Fluoreszenzsignals ein Maß für die proteolytische Aktivität. Weitere Erklärungen im Text.

Die Endothelzellen wurden, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, vorbereitet und anschließend kalt inkubiert (4°C). Nach unterschiedlich langen Kaltinkubationszeiten, wurde der Zellüberstand entfernt und die Zellen lysiert. Die Zellen wurden - soweit nicht anders angegeben - mit einem Lysepuffer (4°C) bestehend aus 100 mM Tris-HCl, 145 mM NaCl, 10 mM EDTA und 0,5% Triton X-100 bei einem pH von 7,25 für 5 min lysiert. Es wurden jeweils 200  $\mu$ l Lysat bzw. Zellüberstand entnommen und diese dann mit 90  $\mu$ l Messpuffer (siehe weiter unten) und 10  $\mu$ l Proteasesubstrat (50  $\mu$ M Endkonzentration) inkubiert.

Die Substratspaltung, als Maß für die enzymatische Aktivität, wurde dann in einem Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät (Fluoroskan II, Labsystems, Helsinki, Finnland) bestimmt ( $\lambda_{\text{exc.}}$  = 355 nm und  $\lambda_{\text{em.}}$  = 460 nm). Für die Kalibrierung des Gerätes und das Erstellen einer Eichgerade wurde nicht peptidgebundenes, fluoreszierendes AMC benutzt. Die Proteaseaktivitäten (als Summe der Aktivitäten von Lysat und Zellüberstand) sind jeweils in pmol  $\times$  min<sup>-1</sup>/mg Protein angegeben.

### **3.7.2 Bestimmung der Cystein- und Serinproteaseaktivitäten**

Für den Aktivitätsnachweis von Cystein- bzw. Serinproteasen wurden die Zellen wie oben beschrieben lysiert. Als Fluoreszenzsubstrate dienten Suc-Leu-Tyr-AMC bzw. Suc-Ala-Ala-Ala-AMC (beide in einer Endkonzentration von 50  $\mu$ M) in einem Messpuffer aus 25 mM Tris-HCl (Ferguson et al., 1993) und einem pH von 7,25.

### **3.7.3 Bestimmung der Calpainaktivität**

Der Calpainnachweis wurde im Wesentlichen wie in (Kohli et al., 1997) beschrieben durchgeführt. Als Substrat wurde Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (50  $\mu$ M Endkonzentration) verwendet. Der hier benutzte Messpuffer enthielt 100 mM Tris-HCl,

145 mM NaCl und 10 mM EDTA bei einem pH von 7,25 mit oder ohne 18 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (entsprechend einer freien Calciumkonzentration von 8,5 mM).

#### **3.7.4 Bestimmung der Cathepsin B-Aktivität**

Die Zellen wurden mit einem Lysepuffer (4°C), der zugleich auch als Messpuffer diente, aus 20 mM MOPS (Faubion et al., 1999) und 0,5% Triton X-100 bei einem pH von 6,0 für 5 min lysiert. Die Cathepsin B-Aktivität wurde mit Hilfe des Fluoreszenzsubstrates z-Arg-Arg-AMC (50  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) bestimmt. Wegen der außergewöhnlich hohen Pufferkapazität der HTK-Überstände (HTK enthält 198 mM Histidin), mußte deren pH noch zusätzlich auf 6,0 nachgestellt werden.

#### **3.7.5 Bestimmung der Proteasomaktivität**

Die Aktivitätsbestimmung wurde entsprechend der unterschiedlichen Untereinheiten des Proteasoms mit drei Fluoreszenzsubstraten durchgeführt. So fand für den Nachweis der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität das Fluoreszenzsubstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC Anwendung, während die Trypsin-ähnliche Aktivität und die Peptidylglutamyl-Peptid-Hydrolase-Aktivität mit den Substraten *N*-t-Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC bzw. z-Leu-Leu-Glu-AMC bestimmt wurden (Endkonzentrationen aller drei Substrate 50  $\mu\text{M}$ ). Alle drei Aktivitäten wurden in einem Messpuffer mit einem pH von 7,5, bestehend aus 50 mM Tris, 20 mM KCl, 1 mM Magnesiumacetat, 2 mM DTT, 1 mM Leupeptin, 1 mM PMSF und 1  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin, bestimmt (Sitte et al., 2000).

#### **3.7.6 Bestimmung der Caspaseaktivität**

Die Zellen wurden mit einem Lysepuffer (4°C) aus 25 mM HEPES, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,1% CHAPS und 0,5% Triton X-100 bei einem pH von 7,25 lysiert. Die Aktivität wurde mit dem Fluoreszenzsubstrat Ac-DEVD-AMC (50  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) in einem Messpuffer bestehend aus 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,1% CHAPS, 10% Saccharose, 10  $\mu\text{g/ml}$  Pepstatin A, 10  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin und 1 mM PMSF mit einem pH von 7,25 bestimmt.

### **3.8 Immunopräzipitation des Proteasoms**

Die Immunopräzipitation des Proteasoms wurde freundlicherweise in Kooperation mit Herrn Priv.-Doz. Dr. T. Grune (ehemals Neurowissenschaftliches Forschungszentrum Charité, Berlin, jetzt Institut für umweltmedizinische Forschung, Bereich molekulare Altersforschung, der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) von dessen Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die Probe wurde mit einem Anti-20S-Proteasom-Antikörper für 2 h bei 4°C inkubiert. Nachdem der Protein-Antikörper-Komplex an den Adsorbens bestehend aus Protein A Sepharose CL-4B gebunden hatte, wurde die Sepharose durch Zentrifugation abgetrennt. In dem nun erhaltenen Überstand wurde die Proteasomaktivität gemessen (Grune et al., 1995).

### **3.9 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zu 10 µl Probe wurde jeweils 1 ml Bradford-Reagenz (1 mg/l Coomassie Brilliant-Blau G250, 5% Ethanol und 8,5% Phosphorsäure) hinzugegeben. Das Gemisch wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Für die Standards wurden 0,1-1 mg bovines Serumalbumin (BSA), jeweils im entsprechenden Medium gelöst, verwendet (Bradford, 1976).

### **3.10 Thiobarbitursäure-Test**

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen der kälteinduzierten Apoptose führt zur Peroxidation von Fettsäuren der Phospholipide der Membranen. Hierbei kommt es im Rahmen einer Reaktionskette u. a. zur Bildung von so genannten Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS), zu denen auch das Malondialdehyd (MDA) zählt. Dieses reagiert mit Thiobarbitursäure (TBA) unter Bildung eines Chromogens, so dass die Absorption im Photometer ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ) erfasst werden kann (Noll et al., 1987).

Für diesen Test wurde jeweils 1 ml Probe (Zellüberstand) zu 0,2 ml einer eisgekühlten Trichloressigsäurelösung (80% in A. bidest) in ein Eppendorfcup pipettiert und anschließend bei 10.000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Hiernach wurde wiederum 1 ml des nun verbleibenden Überstandes entnommen, dieser mit 0,5 ml

TBA-Lösung (1% in A. bidest, pH 7,0) in einem Reagenzglas gemischt und bei 95°C im Wasserbad für 10 min erhitzt. Daraufhin folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 min bei 10.000 U/min), und die Proben wurden gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Menge der gebildeten TBARS wurde ausgedrückt als Malondialdehydäquivalent unter Verwendung von 1,1,3,3-Tetramethoxypropan als Standard.

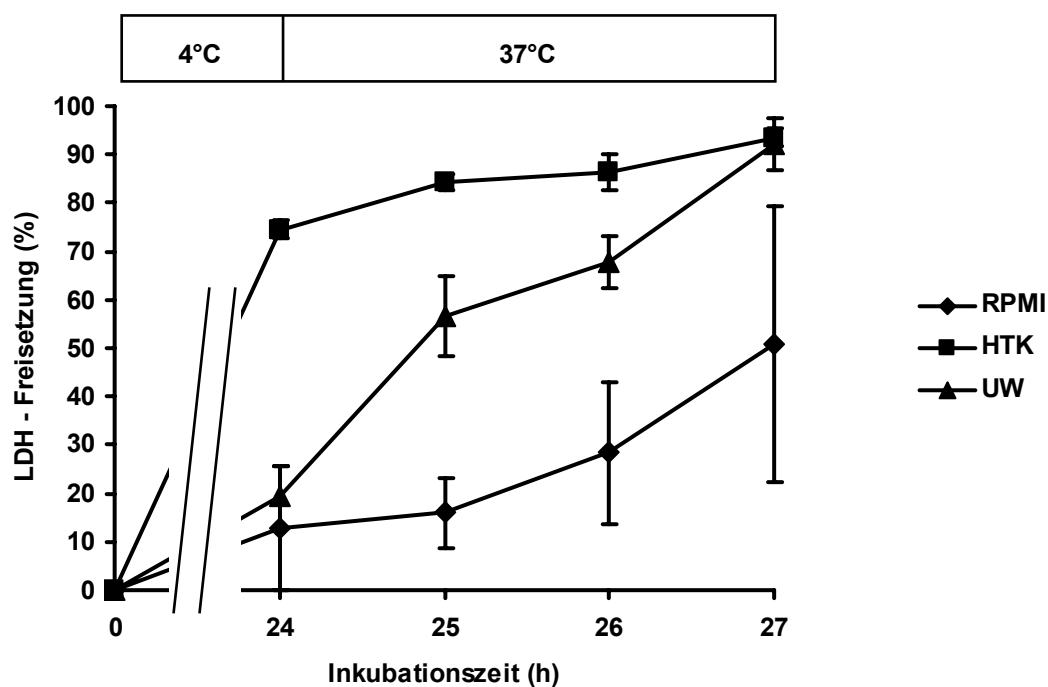
### **3.11 Statistik**

Sämtliche Experimente wurden drei- bis viermal wiederholt. Die angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD). Beim Vergleich der Daten aus zwei unterschiedlichen Gruppen wurde der Students' *t*-Test herangezogen, wohingegen bei mehr als zwei Gruppen eine Multivarianzanalyse (ANOVA) durchgeführt wurde. Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant erachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Kälteinduzierte Apoptose kultivierter Leberendothelzellen

Wurden kultivierte sinusoidale Rattenleberendothelzellen in Zellkulturmedium (RPMI 1640) bei einer Temperatur von 4°C inkubiert, so zeigten diese eine Zellschädigung, deren Ausmaß abhängig von der Dauer der Kaltinkubation war (Daten nicht gezeigt) und die während der sich anschließenden Wiedererwärmung (37°C) deutlich zunahm (Abb. 3).



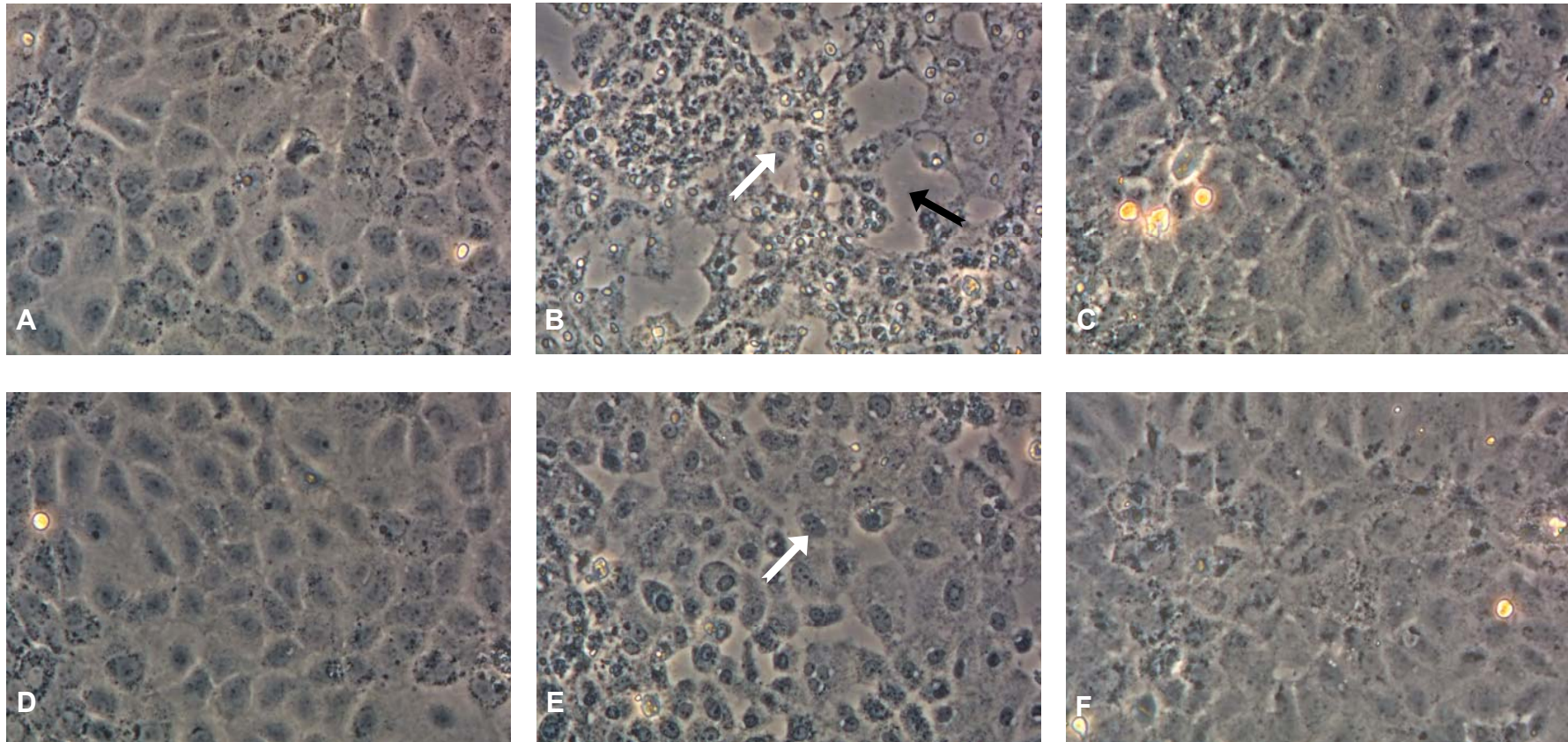
**Abb. 3. Kälteinduzierte Apoptose kultivierter Leberendothelzellen.** Sinusoidale Rattenleberendothelzellen wurden in Zellkulturmedium (RPMI 1640) und in den Konservierungslösungen Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK) und University of Wisconsin (UW) für 24 h kalt inkubiert (4°C) und anschließend für 3 h wiedererwärmt (37°C). Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.



Wie von der Arbeitsgruppe zuvor beschrieben (Rauen et al., 1999), erfüllte diese Zellschädigung viele Kriterien eines apoptotischen Zelltodes. So führte die bloße Sequenz Kaltinkubation/Wiedererwärmung von Leberendothelzellen in Zellkulturmedium zu morphologischen Veränderungen wie Zell- und Kernschrumpfung, Kernfragmentation und so genannten „apoptotic bodies“ wie sie typisch für einen apoptotischen Zelltod sind (Daten nicht dargestellt).

Nach der Kaltinkubation der Endothelzellen in den Konservierungslösungen HTK und UW kam es - ebenso wie nach der Kaltinkubation in Zellkulturmedium - zu einer verstärkten Zellschädigung bei der sich anschließenden Wiedererwärmung der Zellen. Die nach Kaltinkubation in diesen Konservierungslösungen auftretende Zellschädigung wies jedoch eine deutliche Akzeleration der kälteinduzierten Schädigung auf (Abb. 3). Diese Akzeleration der kälteinduzierten Schädigung war besonders stark ausgeprägt nach der Kaltinkubation der Endothelzellen in der HTK-Lösung (Abb. 3 und 4).

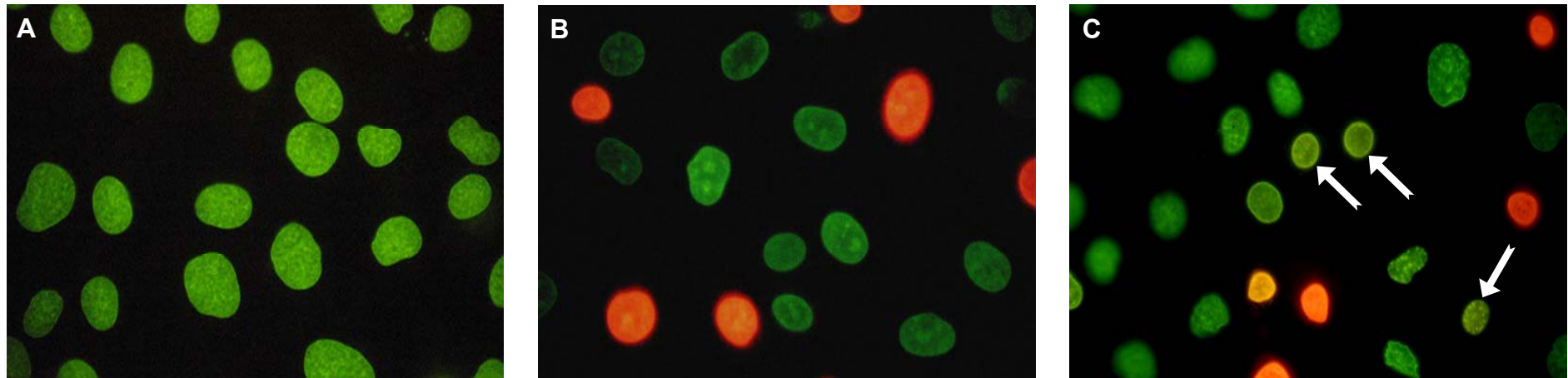
Nicht nur nach der Kaltinkubation der Endothelzellen in Zellkulturmedium (Rauen et al., 1999) und UW-Lösung (Kerkweg et al., 2002), sondern auch nach der Kaltinkubation der Zellen in der ebenfalls klinisch eingesetzten HTK-Lösung, kam es zu einer kälteinduzierten Apoptose. In der phasenkontrastmikroskopischen Aufnahme zeigten sich nach der Sequenz Kaltinkubation/Wiedererwärmung der Endothelzellen in den Konservierungslösungen HTK und UW die typischen apoptotischen Kern- und Zellschrumpfungen sowie das Auftreten von apoptotic bodies (Abb. 4).



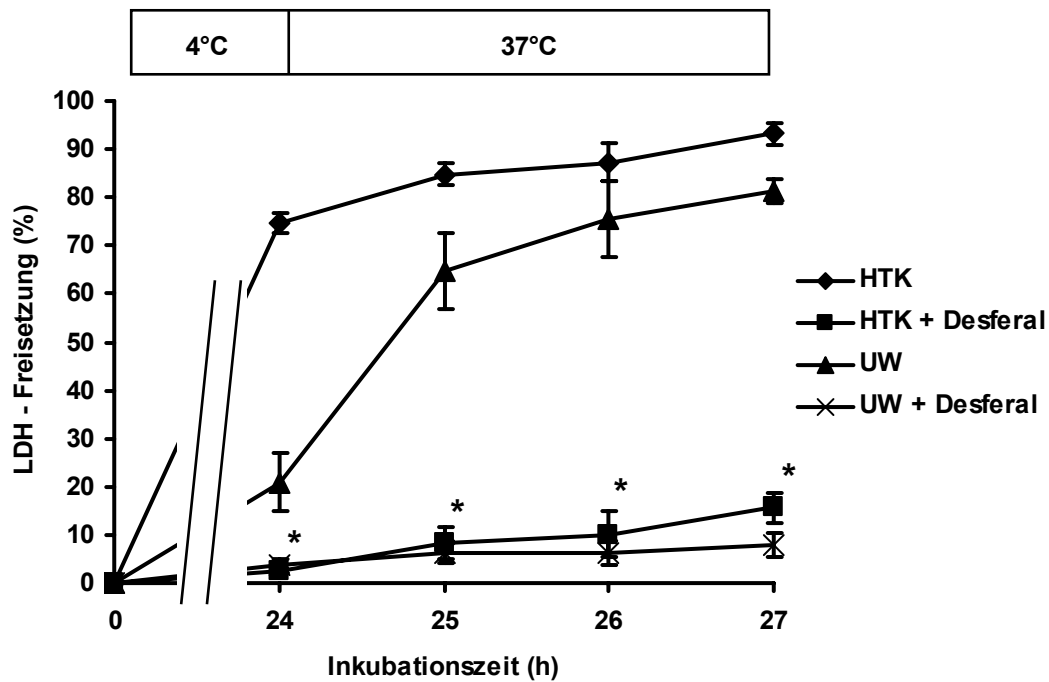
**Abb. 4. Morphologische Veränderungen kultivierter Leberendothelzellen nach Kaltinkubation/Wiedererwärmung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden in den Konservierungslösungen Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK) (B und C) und University of Wisconsin (UW) (E und F) mit (C und F) bzw. ohne (B und E) den (Serin-) Proteaseinhibitor 3,4-Dichloroisocumarin (DCI, 500  $\mu$ M) für 24 h kalt inkubiert (4°C) und dann für 2 h in Zellkulturmedium wiedererwärmt (37°C). Die morphologischen Veränderungen wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie beurteilt. Deutlich zu sehen sind die nach Kaltinkubation/Wiedererwärmung auftretenden Zell- und Kernschrumpfungen (B und E, weiße Pfeile), besonders ausgeprägt nach Kaltinkubation in HTK-Lösung (B). Nach der Kaltinkubation in HTK-Lösung kam es auch zum Ablösen (toter) Zellen (B, schwarzer Pfeil). In Gegenwart von DCI (500  $\mu$ M) waren die morphologischen Veränderungen der Zellen nach Kaltinkubation in beiden Konservierungslösungen fast komplett gehemmt (vgl. C u. F zu B u. E). Zum Vergleich zeigen (A) und (D) Zellen, die unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert wurden.

Durch eine Kerndoppelfärbung der Zellkerne mit den Farbstoffen Hoechst H33342 und Propidiumjodid nach Kaltinkubation in HTK-Lösung ließ sich die für einen apoptotischen Zelltod typische Schrumpfung des Zellkerns darstellen (Abb. 5). Diese erfolgte bevor die Funktion der Plasmamembran als Permeabilitätsbarriere eingeschränkt war (Propidiumjodid ist unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage, die Zellmembran zu penetrieren, ist somit also ein Marker avitaler Zellen, während der Hoechstfarbstoff auch die intakte Zellmembran einer vitalen Zelle penetrieren kann). Die apoptotischen morphologischen Veränderungen ließen sich auch in der HTK-Lösung nur bei der Wiedererwärmung der Zellen darstellen.

Wie bereits oben beschrieben (s. Kap. 1.3) wird die kälteinduzierte Apoptose sinusoidaler Leberendothelzellen durch eine Erhöhung des chelatisierbaren Eisenpools vermittelt. Aufgrund dieser Eisenabhängigkeit der kälteinduzierten Apoptose ließ sich durch Vorinkubation der Zellen mit dem Eisenchelator Desferal (10 mM, 30 min, 37°C) vor der Kaltinkubation der Zellen in den Konservierungslösungen HTK und UW die kälteinduzierte Apoptose nahezu vollständig hemmen. Desferal führte hierbei nicht nur zu einer fast kompletten Hemmung der Zellschädigung (Abb. 6), sondern verhinderte auch das Auftreten der typischen, apoptotischen, morphologischen Veränderungen (Daten nicht gezeigt).



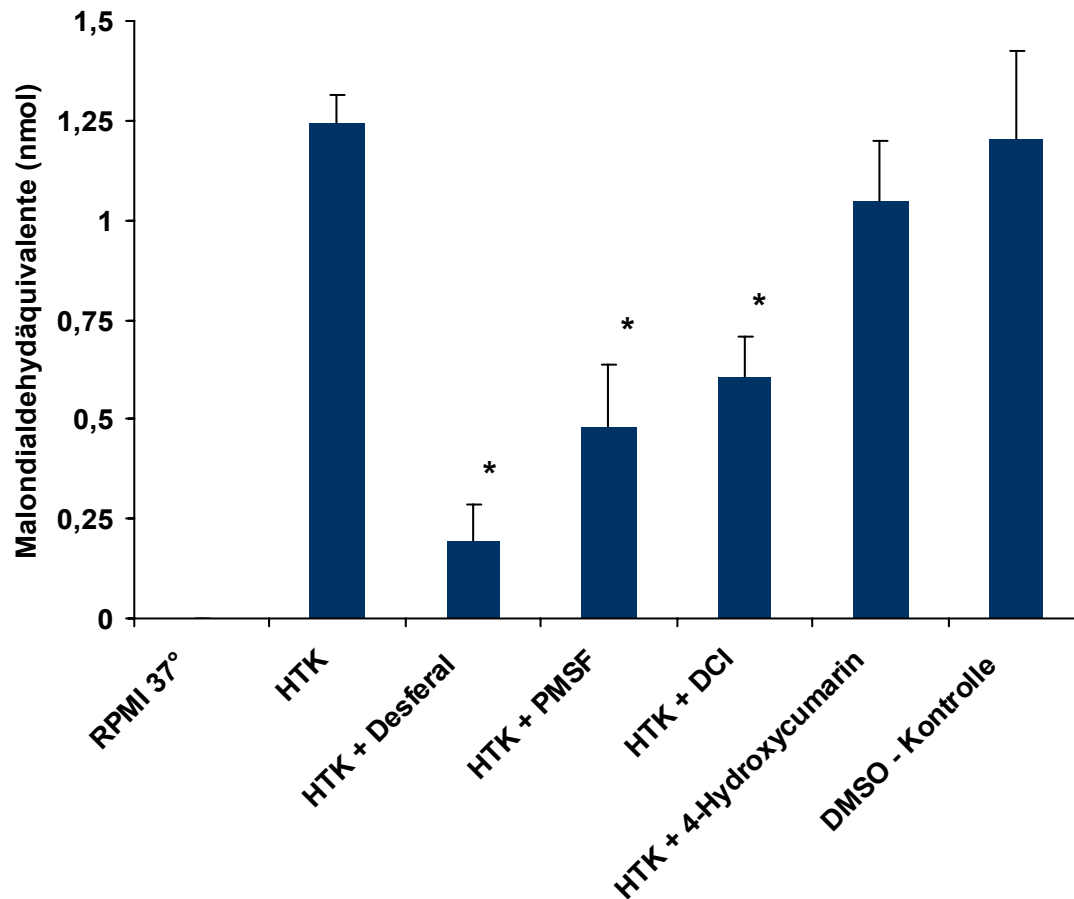
**Abb. 5. Kerndoppelfärbung sinusoidaler Endothelzellen mit den Farbstoffen Hoechst H33342 und Propidiumjodid.** Sinusoidale Rattenleberendothelzellen wurden für 6 h in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) kalt inkubiert (4°C). Einige sinusoidale Endothelzellen wurden direkt nach der Kaltinkubation mit Hoechst H33342 (grüner Farbstoff) und Propidiumjodid (roter Farbstoff) angefärbt (B), andere sinusoidale Endothelzellen wurden nach der Kaltinkubation in HTK-Lösung zunächst für 1 h in Zellkulturmedium warm inkubiert (37°C) und dann mit den oben genannten Farbstoffen angefärbt (C). Zum Vergleich unbehandelte in Zellkulturmedium (37°C) inkubierte sinusoidale Endothelzellen (A). Deutlich zu sehen ist, dass es nach der Sequenz Kaltinkubation/Wiedererwärmung von sinusoidalen Endothelzellen zu einer Kernschrumpfung der (noch vitalen) Zellen als Zeichen der beginnenden Apoptose kam (C, weiße Pfeile). Als Nebebefund in (C) zu sehen sind bereits apoptotische, tote Zellen (rote Zellkerne) und solche, die sich in einem Stadium kurz vor dem manifesten (apoptotischen) Zelltod befanden (gelborange Zellkerne). Reine Kaltinkubation in HTK-Lösung führte zwar auch zum Zelltod (rote Zellkerne), die Zellkerne sind jedoch nicht apoptotisch verändert und zeigen keine wesentliche Kernschrumpfung (B). Die vitalen Zellen (grüne Zellkerne) ähneln nach reiner Kaltinkubation in HTK-Lösung (B) noch sehr den Zellkernen unbehandelter sinusoidaler Endothelzellen (A).



**Abb. 6. Hemmung der kälteinduzierten Apoptose durch Desferal.** Sinusoidale Endothelzellen wurden in den Konservierungslösungen Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK) und University of Wisconsin (UW) für 24 h bei 4°C inkubiert und anschließend bei 37°C in Zellkulturmedium wiedererwärmt. Einige Zellen wurden vor Beginn der Kaltinkubation mit dem Eisenchelator Desferal vorinkubiert (10 mM, 30 min in Zellkulturmedium, 37°C). Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur Inkubation ohne Desferal im entsprechenden Medium,  $p < 0,05$ .

Durch die Erhöhung des chelatisierbaren Eisenpools im Rahmen der kälteinduzierten Apoptose (s. o.) kommt es, nach vorausgegangener Kaltinkubation der Zellen in Zellkulturmedium und UW-Lösung, zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, deren Bildung zur Lipidperoxidation zellulärer Membranen führt (Rauen et al., 1999; Kerkweg et al., 2002). Inkubierte man Endothelzellen für 24 h bei 4°C in der Konservierungslösung HTK, so ließ sich auch hier eine deutliche Lipidperoxidation nachweisen, verglichen mit jenen Zellen, die unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert wurden (Abb. 7). Aufgrund der eisenabhängigen Bildung von ROS konnte durch die Vorinkubation der Zellen mit dem Eisenchelator Desferal (10 mM, 30 min in Zellkulturmedium, 37°C) eine fast vollständige Unterdrückung der Lipidperoxidation erzielt werden (Abb. 7).



**Abb. 7. Lipidperoxidation nach 24 h Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 24 h in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) (4°C) inkubiert. Einige Zellen wurden mit Desferal vorinkubiert (10 mM, 30 min in Zellkulturmedium, 37°C). Andere Zellen wurden mit Phosphomethylsulfonylfluorid (PMSF) vorinkubiert (4 mM, 1 h in Zellkulturmedium, 37°C) und dieses dann noch zusätzlich unmittelbar vor der Kaltinkubation zur HTK-Lösung hinzugegeben. 3,4-Dichloroisocumarin (DCI, 500 µM) wurde vor der Kaltinkubation der HTK-Lösung hinzugegeben. 4-Hydroxycumarin (500 µM) diente als Negativkontrolle zu DCI, und Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle. Zum Vergleich ist die Lipidperoxidation unbehandelter, unter normalen Zellkulturbedingungen inkubierter Zellen dargestellt (RPMI 37°C). Die Menge der gebildeten Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS, Maß für die Lipidperoxidation) ist ausgedrückt als Malondialdehydäquivalente in nmol/Versuchsansatz. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

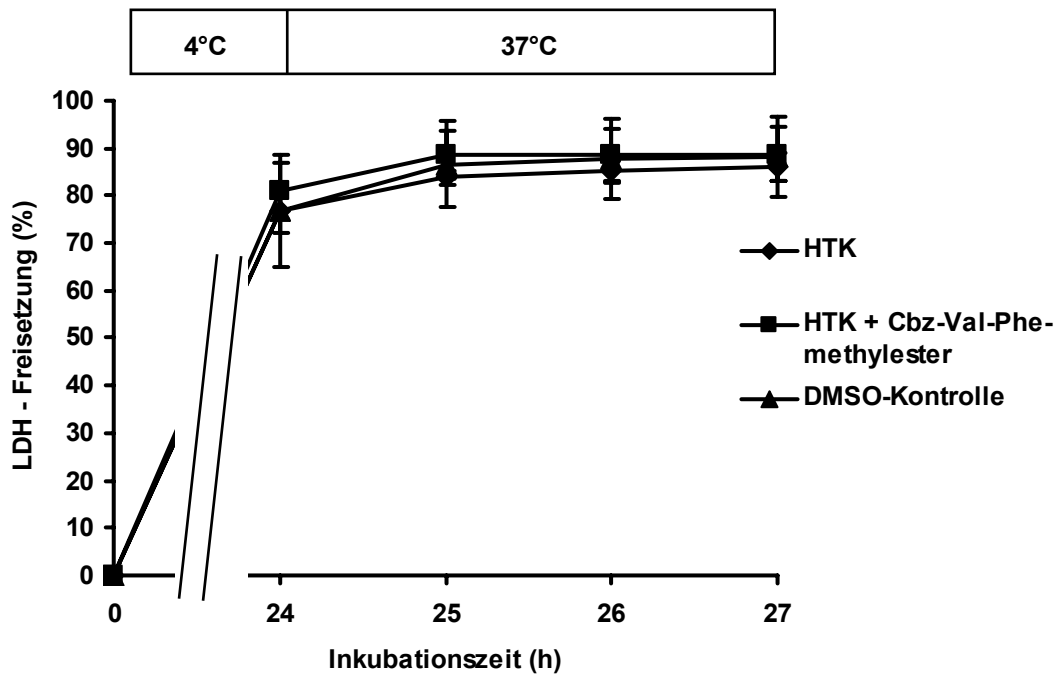
\*signifikant unterschiedlich zur Inkubation in HTK-Lösung (ohne Zusätze) bzw. zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Kontrolle),  $p < 0,05$ .

## **4.2 Effekte von Proteaseinhibitoren auf die kälteinduzierte Apoptose kultivierter Leberendothelzellen**

Um einen ersten Hinweis zu erhalten, ob Proteasen bei der kälteinduzierten Apoptose sinusoidaler Rattenleberendothelzellen beteiligt sind, wurden diese in Gegenwart unterschiedlicher Proteaseinhibitoren inkubiert und das Ausmaß der Zellschädigung gemessen. Hierbei wurde versucht, besonders jene Proteasen zu inhibieren, deren Beteiligung bei der Konservierungsschädigung der Leber in der Literatur bereits diskutiert wird. Es sind dies insbesondere - wie bereits weiter oben dargestellt - Calpaine, Caspasen und Aspartatproteasen. Für die Hemmung von Matrixmetalloproteasen, die ebenfalls im Rahmen der Konservierungsschädigung der Leber diskutiert werden (s. o.), mußte aus Gründen, die weiter unten aufgeführt werden (Kap. 4.2.3), auf den bekanntesten Inhibitor verzichtet und auf einen Ersatz ausgewichen werden. Darüber hinaus kamen weitere Proteaseinhibitoren zum Einsatz, die auch jene Proteasen hemmen sollten, deren Beteiligung bisher nur in anderen Apoptosemodellen nachgewiesen wurde (z. B. Cathepsine und Serinproteasen).

#### 4.2.1 Effekt des Calpaininhibitors Cbz-Val-Phe-Methylester

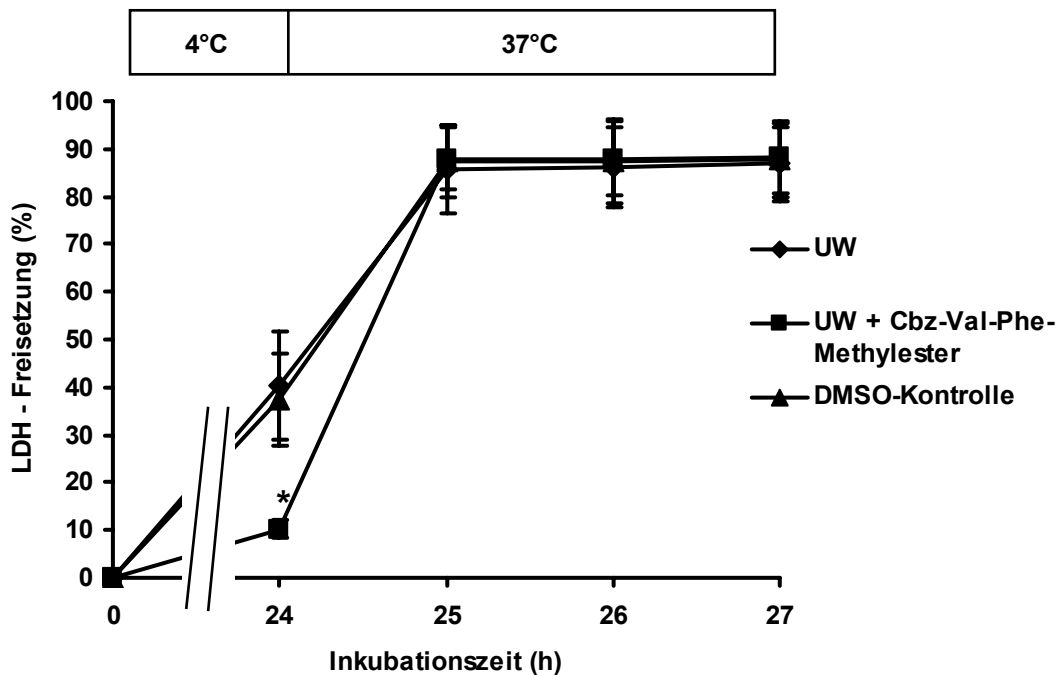
Um Hinweise auf eine Beteiligung von Calpainen zu erhalten, wurde der Inhibitor Cbz-Val-Phe-Methylester (100  $\mu$ M) verwendet. Dieser gängige und als weitgehend spezifisch geltende Calpaininhibitor zeigte keine protektive Wirkung nach Kaltinkubation der Endothelzellen in der HTK-Lösung (Abb. 8).



**Abb. 8. Effekt von Cbz-Val-Phe-Methylester auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) für 24 h (4°C) inkubiert und anschließend in Zellkulturmedium wiedererwärmt (37°C). Einige Zellen wurden 1 h mit Cbz-Val-Phe-Methylester (100  $\mu$ M) in Zellkulturmedium bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde der Inhibitor nach dem Mediumwechsel (auf HTK-Lösung) unmittelbar vor der Kaltinkubation erneut hinzugefügt (100  $\mu$ M). Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

Nach Inkubation der Zellen in der UW-Lösung zeigte sich hier lediglich nach 24 h reiner Kaltinkubation ein schwach ausgeprägter Effekt. Dieser schwache, aber signifikante Inhibitoreffekt ließ sich jedoch im weiteren Inkubationsverlauf während der Wiedererwärmung der Zellen - ähnlich dem Verlauf in der HTK-Lösung - nicht mehr nachweisen (Abb. 9).



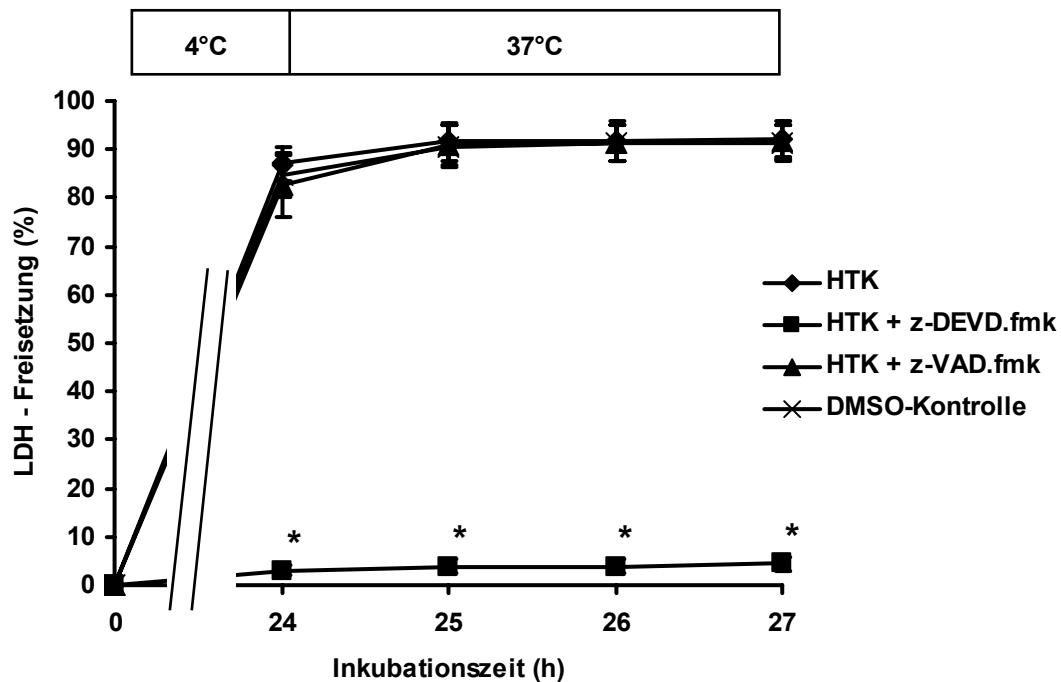


**Abb. 9. Effekt von Cbz-Val-Phe-Methylester auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in UW-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden in der University of Wisconsin-Lösung (UW) für 24 h (4°C) inkubiert und anschließend in Zellkulturmedium wiedererwärmt (37°C). Einige Zellen wurden 1 h mit Cbz-Val-Phe-Methylester (100 µM) in Zellkulturmedium bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde der Inhibitor nach dem Mediumwechsel (auf UW-Lösung) unmittelbar vor der Kaltinkubation erneut hinzugefügt (100 µM). Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Kontrolle),  $p < 0,05$ .

#### 4.2.2 Effekte der Caspaseinhibitoren z-VAD.fmk und z-DEVD.fmk

Zur Untersuchung einer möglichen Caspasebeteiligung kamen zwei differente Inhibitoren zum Einsatz. Zum einen wurde versucht, durch einen Pancaspaseinhibitor (z-VAD.fmk) eine Caspasebeteiligung allgemein zu erfassen. Zum anderen wurde der in der Literatur am häufigsten verwendete Caspase-3-Inhibitor z-DEVD.fmk eingesetzt. Nach der Kaltinkubation der Endothelzellen in der HTK-Lösung unter Verwendung dieser Inhibitoren zeigte sich jedoch durch den Einsatz von z-VAD.fmk (100 µM) keinerlei Effekt auf das Überleben der Zellen, wohingegen es zu einer deutlichen Protektion der Endothelzellen in Gegenwart des Caspase-3-Inhibitors z-DEVD.fmk (100 µM) kam (Abb. 10). Dieser sehr gute Schutzeffekt von z-DEVD.fmk ließ sich allerdings in einem Konzentrationsbereich des Inhibitors von 10-25 µM nicht mehr nachweisen (Daten nicht dargestellt).

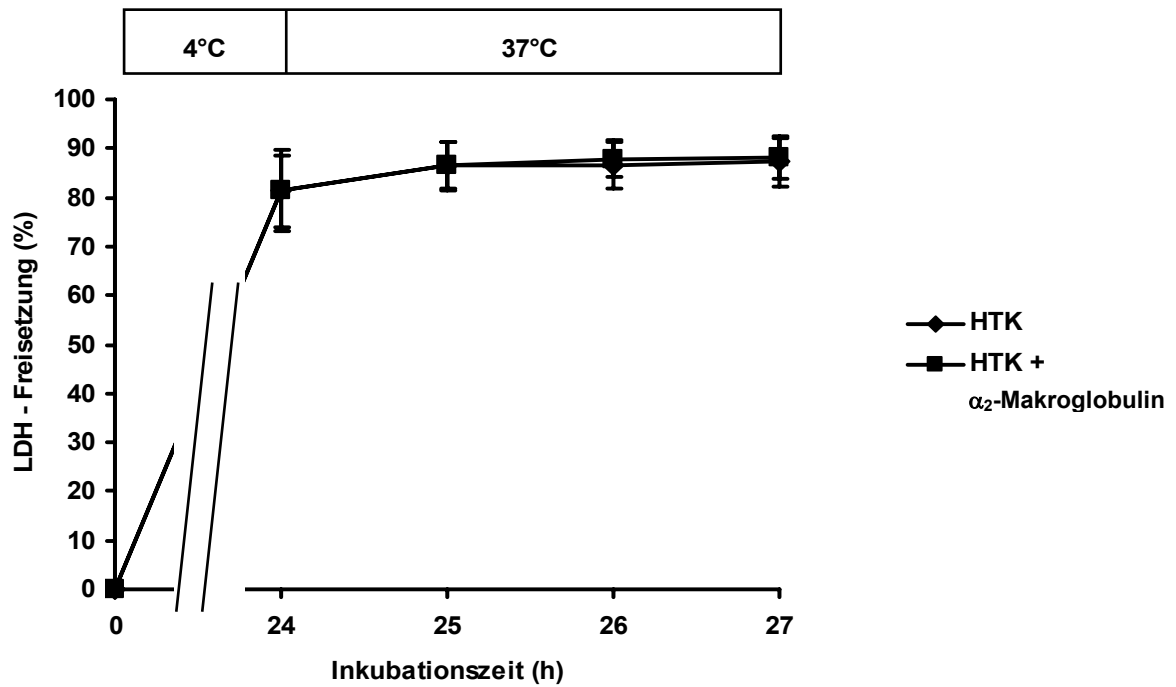


**Abb. 10. Effekt der Caspaseinhibitoren z-VAD.fmk und z-DEVD.fmk auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) für 24 h inkubiert (4°C) und anschließend in Zellkulturmedium wiedererwärmt (37°C). Einige Zellen wurden 1 h mit z-VAD.fmk (100 µM) bzw. z-DEVD.fmk (100 µM) in Zellkulturmedium bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde der Inhibitor nach dem Mediumwechsel (auf HTK-Lösung) unmittelbar vor der Kaltinkubation erneut hinzugefügt (100 µM). Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Kontrolle),  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3. Effekt des Matrixmetalloproteaseinhibitors $\alpha_2$ -Makroglobulin

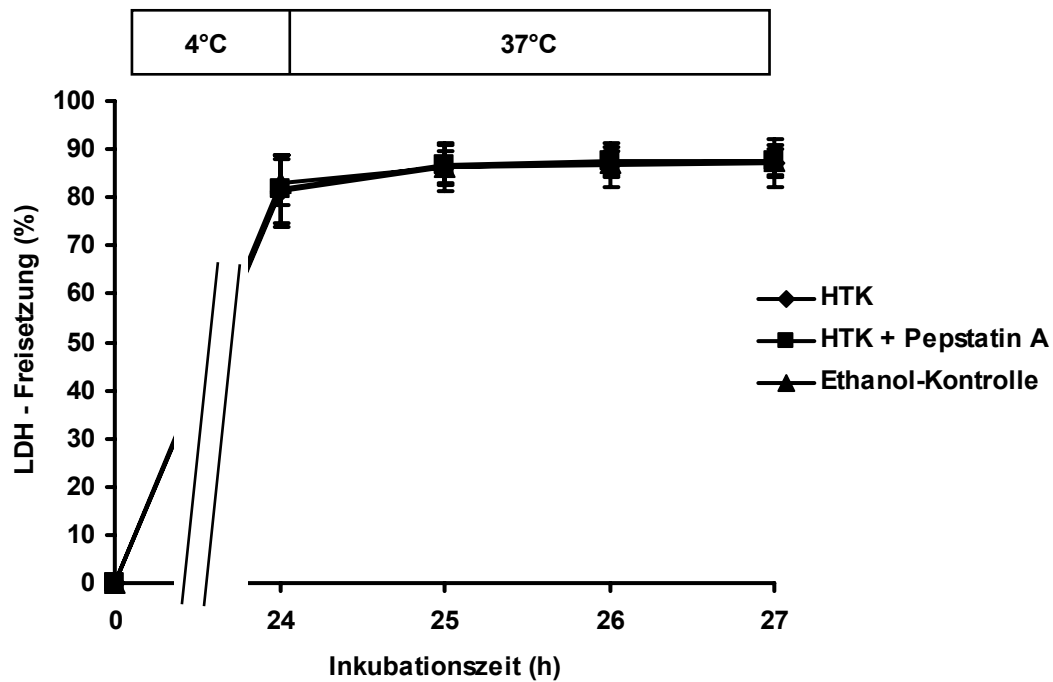
Da die typischen Matrixmetalloproteaseinhibitoren wie 1,10-Phenanthrolin auch Eisenchelatoren sind (und damit die eisenabhängige Kälteschädigung auch auf proteaseunabhängigen Weg hemmen könnten), wurde hier  $\alpha_2$ -Makroglobulin (100 µg/ml), ein nicht-membrangängiges Makroprotein, als Inhibitor für MMP verwendet. Dieser MMP-Inhibitor (Raza & Cornelius, 2000) zeigte jedoch nach Inkubation der Endothelzellen in der HTK-Lösung keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen (Abb. 11).



**Abb. 11. Effekt des Matrixmetalloproteaseinhibitors  $\alpha_2$ -Makroglobulin auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden 24 h bei 4°C in der Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert und anschließend in Zellkulturmedium für 3 h bei 37°C wiedererwärmt. Einigen Zellen wurde vor Beginn der Kaltinkubation der Matrixmetalloprotease- (MMP-) Inhibitor  $\alpha_2$ -Makroglobulin (100 µg/ml) hinzugefügt. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.4 Effekt des Aspartatproteaseinhibitors Pepstatin A

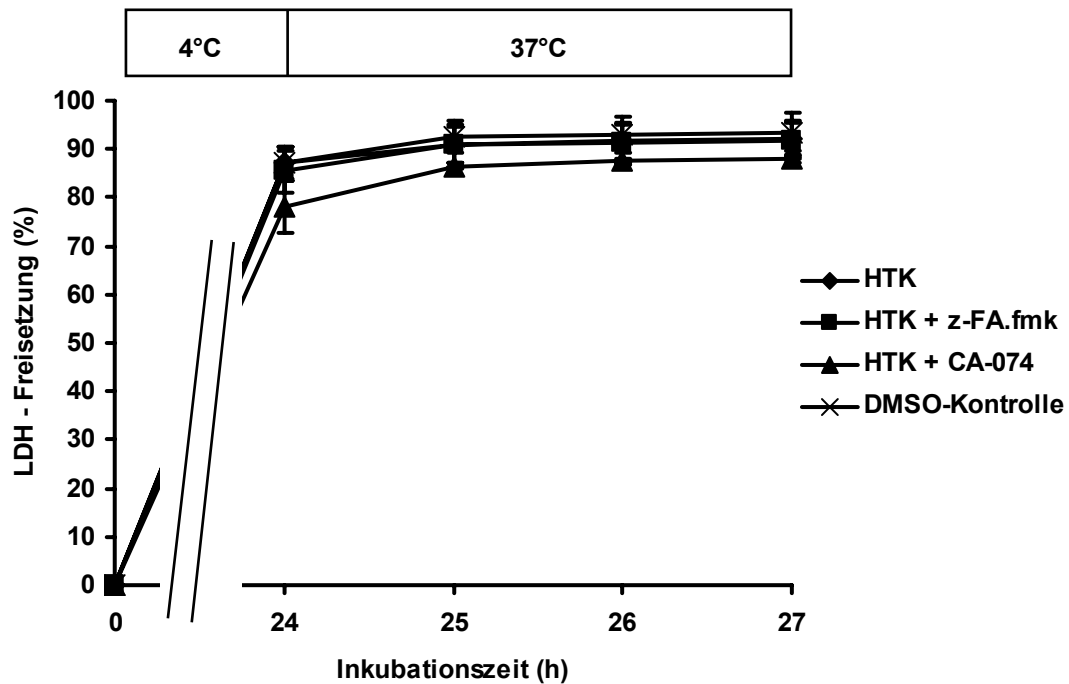
Pepstatin A, ein bekannter, genereller Inhibitor von Aspartatproteasen (Ferguson et al., 1993), führte zu keinem Schutz vor der kälteinduzierten Apoptose nach Kaltinkubation in HTK-Lösung, so dass eine Beteiligung von Aspartatproteasen als eher unwahrscheinlich zu beurteilen ist (Abb. 12).



**Abb. 12. Effekt von Pepstatin A auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden 24 h bei 4°C in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert und nach Mediumwechsel (auf Zellkulturmedium) für 3 h bei 37°C wiedererwärmt. Einigen Zellen wurde vor Beginn der Kaltinkubation der Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A (10 µg/ml) hinzugefügt. Ethanol diente als Lösungsmittelkontrolle. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.5 Effekte der Cathepsin B-Inhibitoren z-FA.fmk und CA-074

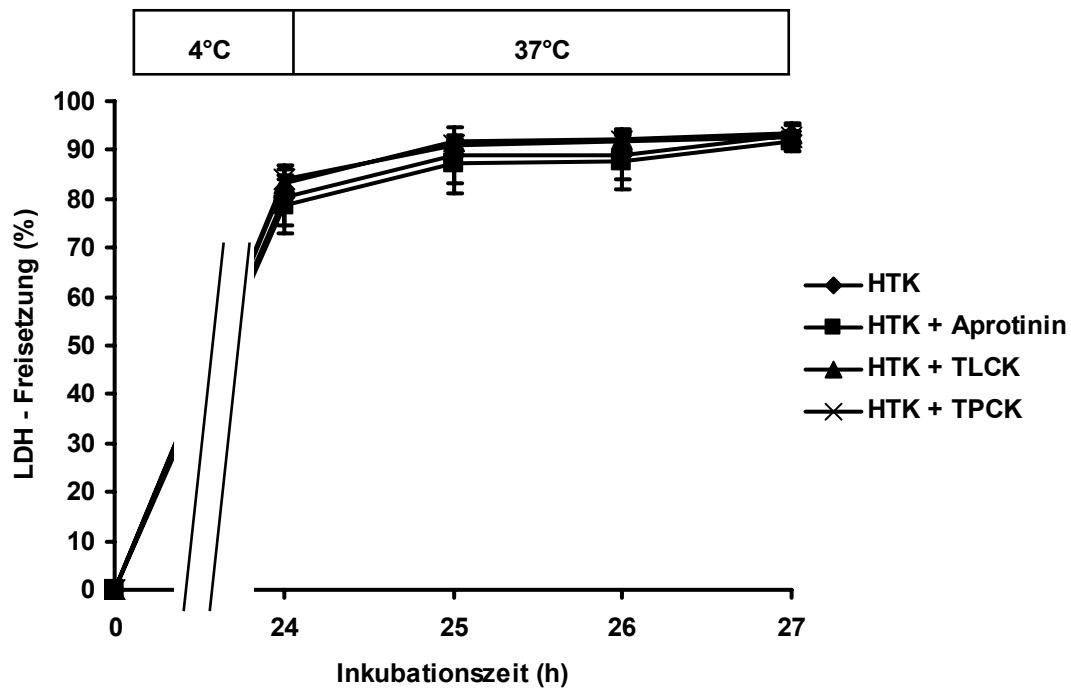
Um zu überprüfen, ob es im Rahmen der kälteinduzierten Apoptose zu einer Beteiligung von Cathepsin B kommt, wurden zwei Cathepsin B-Inhibitoren eingesetzt. Diese beiden Inhibitoren - z-FA.fmk (100 µM) und CA-074 (10 µM) - zeigten jedoch keinen protektiven Effekt (Abb. 13).



**Abb. 13. Effekt der Cathepsin B-Inhibitoren z-FA.fmk und CA-074 auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 24 h in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) bei 4°C inkubiert. Der Inhibitor z-FA.fmk (100 µM) wurde den Zellen unmittelbar vor der Kaltlagerung hinzugegeben. Einige Zellen wurden für 10 min bei 37°C in Zellkulturmedium mit CA-074 (10 µM) vorinkubiert und der Inhibitor erneut vor der Kaltinkubation den Zellen hinzugegeben (10 µM). Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte ± SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

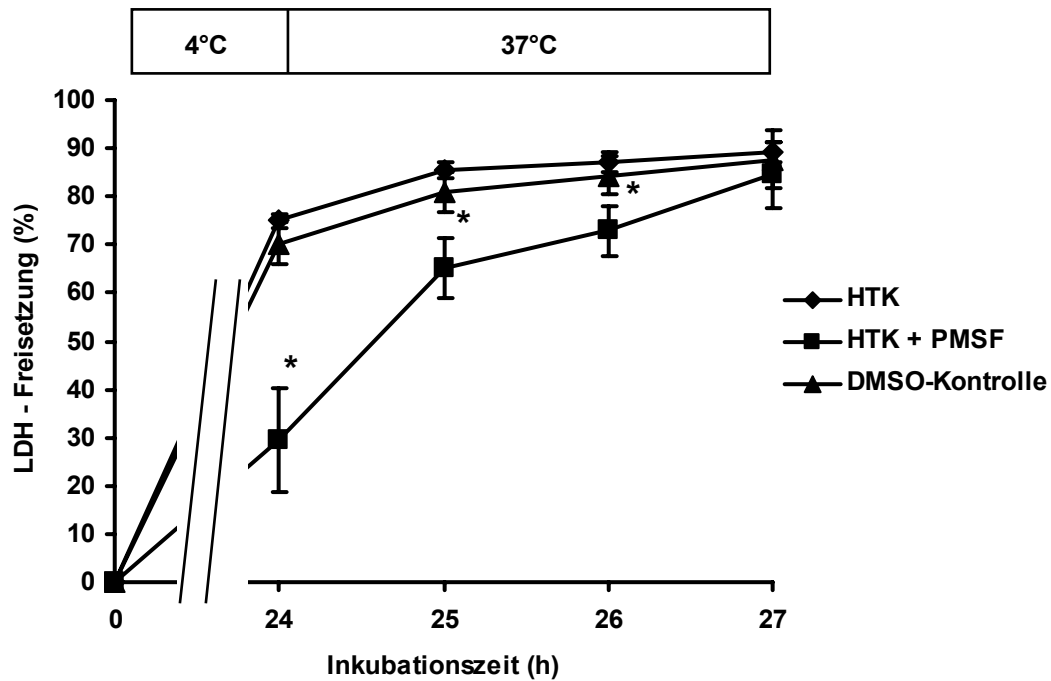
#### 4.2.6 Effekte der Serinproteaseinhibitoren TLCK, TPCK, Aprotinin und PMSF

Zur Überprüfung einer möglichen Beteiligung von Serinproteasen, die in einigen Apoptosemodellen als wichtige Proteasen vorgeschlagen werden, wurden der Inhibitor von Trypsin-ähnlichen Serinproteasen TLCK (100 µM), der Inhibitor von Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen TPCK (100 µM), der als extrazellulär dienende, breite Inhibitor von Serin- (und auch Cystein-) Proteasen Aprotinin (20 µg/ml) (Hummel et al., 2001) und PMSF (4 mM), ein ebenfalls breiter Serinproteaseinhibitor, eingesetzt. Bei den Proteaseinhibitoren TLCK, TPCK und Aprotinin zeigte sich allerdings kein Schutzeffekt nach Kaltinkubation in der HTK-Lösung (Abb. 14).



**Abb. 14. Effekte der Serinproteaseinhibitoren TLCK, TPCK und Aprotinin auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden mit bzw. ohne die Inhibitoren Tosyl-Lysin-Chloromethylketon (TLCK, 100  $\mu$ M), Tosyl-Phenylalanin-Chloromethylketon (TPCK, 100  $\mu$ M) und Aprotinin (20  $\mu$ g/ml) für 24 h bei 4°C in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert und für 3 h in Zellkulturmedium wiedererwärmt (37°C). Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

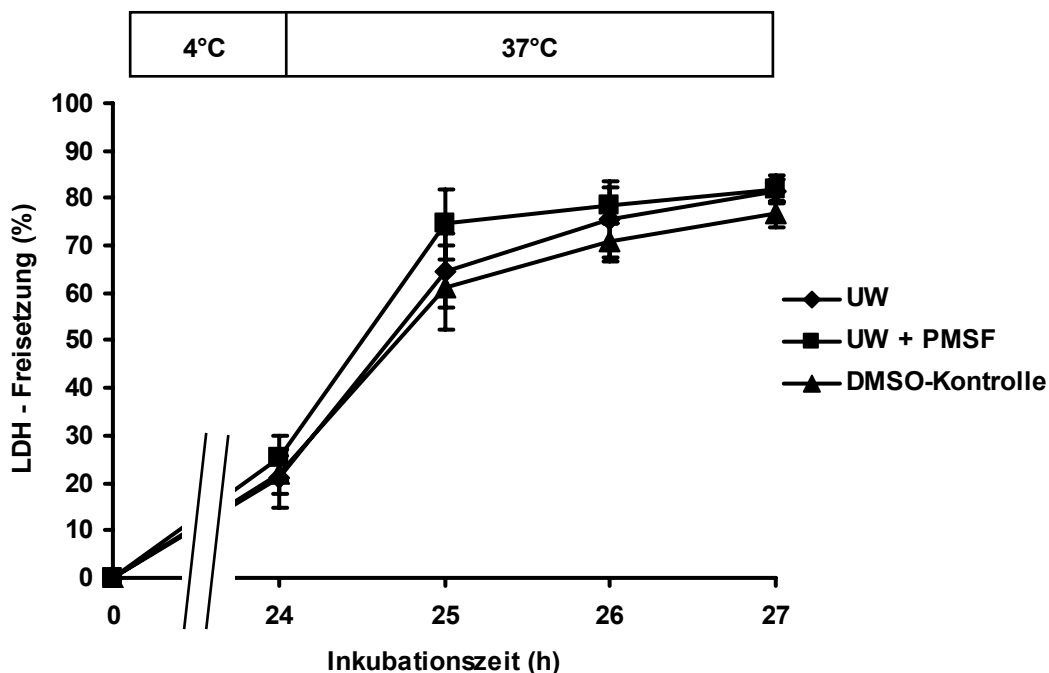
Überraschenderweise kam es jedoch in Gegenwart des irreversiblen Serinproteaseinhibitors PMSF (4 mM) zu einer signifikanten Zellprotektion nach 24 h Kaltinkubation in der HTK-Lösung. Diese Protektion schwächte sich mit zunehmender Wiedererwärmungszeit (und damit zunehmender Zellschädigung) beträchtlich ab und war nach 3 h Wiedererwärmung nicht mehr nachweisbar (Abb. 15). Zudem vermochte der Serinproteaseinhibitor PMSF (4 mM) die Bildung von TBARS signifikant zu senken (Abb. 7).



**Abb. 15. Effekt des Serinproteaseinhibitors PMSF auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 24 h in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert (4°C). Einige Zellen wurden vor der Kaltinkubation mit Phosphomethylsulfonylfluorid (PMSF) vorinkubiert (4 mM, 1 h im Zellkulturmedium, 37°C) und dann zusätzlich zur Vorinkubation nach dem Mediumwechsel (auf HTK-Lösung) unmittelbar erneut mit PMSF (4 mM) versetzt. Die Wiedererwärmung erfolgte für 3 h in Zellkulturmedium. Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Kontrolle),  $p < 0,05$ .

Die Inkubation der Zellen mit PMSF (4 mM) in der Konservierungslösung UW zeigte dagegen jedoch keinerlei positive Auswirkungen (Abb. 16). Im Gegenteil, es zeigte sich die Tendenz einer leichten Toxizität des Inhibitors.

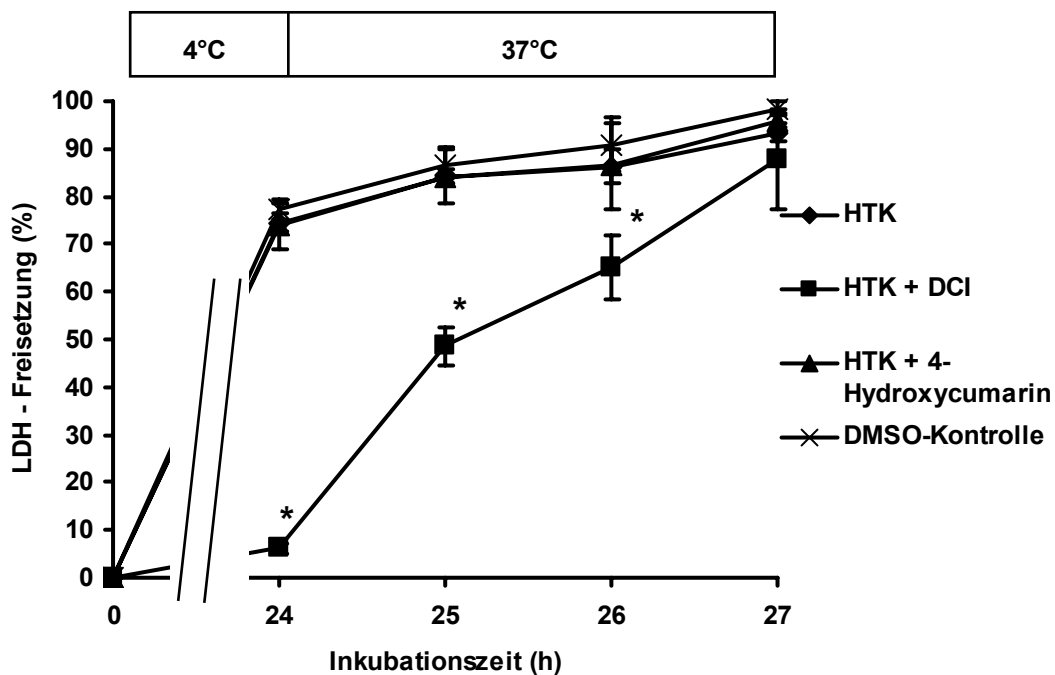


**Abb. 16. Effekt des Serinproteaseinhibitors PMSF auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in UW-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 24 h in University of Wisconsin-Lösung (UW) inkubiert (4°C). Einige Zellen wurden vor der Kaltinkubation mit Phosphomethylsulfonylfluorid (PMSF) vorinkubiert (4 mM, 1 h in Zellkulturmedium, 37°C) und dann zusätzlich zur Vorinkubation nach dem Mediumwechsel (auf UW-Lösung) unmittelbar erneut mit PMSF (4 mM) versetzt. Die Wiedererwärmung erfolgte für 3 h in Zellkulturmedium. Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.7 Protektion durch den Serinproteaseinhibitor DCI

Ausgehend von dem Schutzeffekt durch PMSF bei Inkubation in der HTK Lösung wurde ein weiterer potenter Serinproteaseinhibitor eingesetzt. 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI, 500  $\mu$ M), ein durch Acylierung des aktiven Zentrums irreversibler Inhibitor, zeigte sogar einen noch wesentlich besseren Schutzeffekt als PMSF (Abb. 17). Um einen unspezifischen Effekt des Coumarin-Gerüsts auszuschließen, wurde 4-Hydroxycoumarin (500  $\mu$ M) als Negativkontrolle eingesetzt: 4-Hydroxycoumarin zeigte - anders als DCI - keinen Schutzeffekt (Abb. 17).





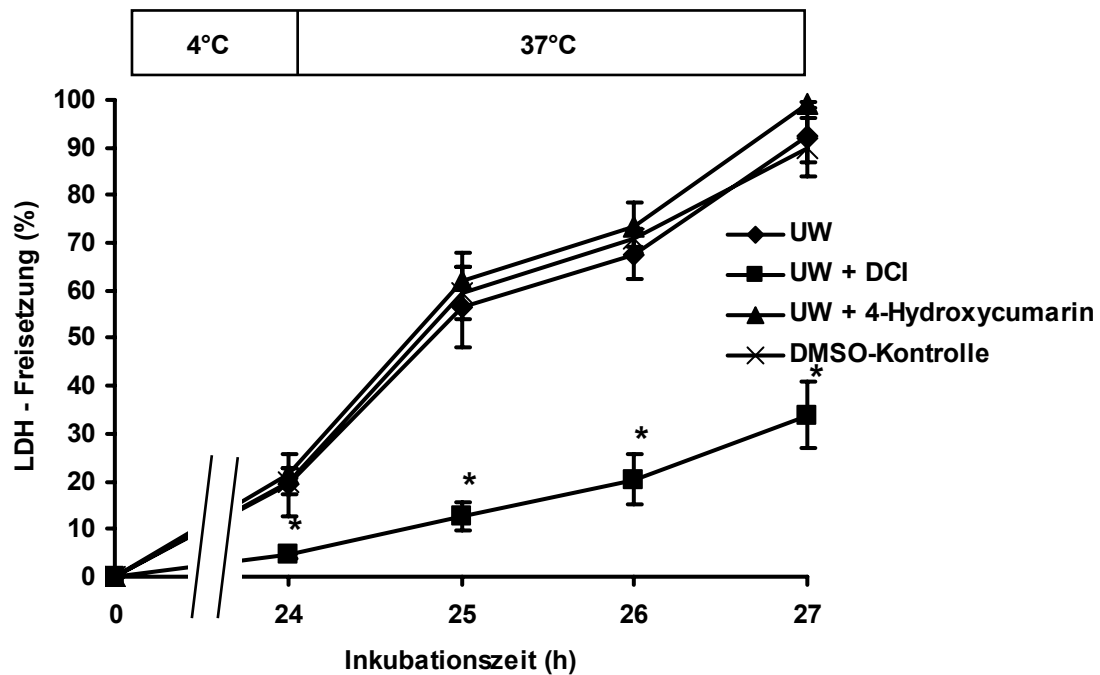
**Abb. 17. Effekt des Serinproteaseinhibitors DCI auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden mit bzw. ohne 3,4-Dichloroisocumarin (DCI, 500  $\mu$ M) 24 h in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert (4°C) und anschließend für 3 h in Zellkulturmedium wiedererwärmt (37°C). 4-Hydroxycumarin (500  $\mu$ M) diente als Negativkontrolle für DCI, und Dimethylsulfoxid (DMSO) war die Lösungsmittelkontrolle. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Kontrolle),  $p < 0,05$ .

Dieser nachweislich ausgeprägte Schutzeffekt von DCI ließ sich nicht nur im Hinblick auf die Vitalität der Zellen nach Kaltinkubation zeigen, sondern betraf auch die Morphologie der Zellen und die Lipidperoxidation. In Gegenwart von DCI (500  $\mu$ M) kam es nach 24 h Kaltinkubation und 2 h Wiedererwärmung nicht mehr bzw. nur geringfügig zu apoptotischen Veränderungen wie Zellschrumpfung, Kernkondensation und Ausbildung von Blebs (Abb. 4). Die Bildung von TBARS als Maß für die Lipidperoxidation wurde, ähnlich wie bei PMSF, signifikant gesenkt (Abb. 7).

Zeigte sich nach Kaltinkubation der Zellen in UW-Lösung in Gegenwart von PMSF kein Schutzeffekt, sondern die Tendenz einer leichten Toxizität des Inhibitors (Abb. 16), so war dies bei DCI nicht der Fall. Im Gegenteil, der Einsatz von DCI (500  $\mu$ M) in der UW-Lösung führte ebenfalls zu einer deutlichen, signifikanten Protektion der Zellen. Diese Protektion ließ sich auch während der gesamten Wiedererwärmungsphase der Zellen nachweisen (Abb. 18). Auch hier ließ sich durch 4-Hydroxycumarin als Negativkontrolle kein Schutzeffekt erzielen (Abb. 18). Ähnlich dem Effekt nach Inkubation in HTK-Lösung zeigte sich auch hier, dass der Schutz

durch DCI nicht nur die Vitalität der Zellen betrifft, sondern auch ihre Morphologie (Abb. 4).



**Abb. 18. Effekt des Serinproteaseinhibitors DCI auf die Zellschädigung bei/nach Kaltinkubation in UW-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden mit bzw. ohne 3,4-Dichloroisocumarin (DCI, 500  $\mu$ M) 24 h in University of Wisconsin-Lösung (UW) inkubiert (4°C) und anschließend für 3 h in Zellkulturmedium wiedererwärmt (37°C). 4-Hydroxycumarin (500  $\mu$ M) diente als Negativkontrolle für DCI, und Dimethylsulfoxid (DMSO) war die Lösungsmittelkontrolle. Als Marker der Zellschädigung diente die Freisetzung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH). Die Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Kontrolle),  $p < 0,05$ .

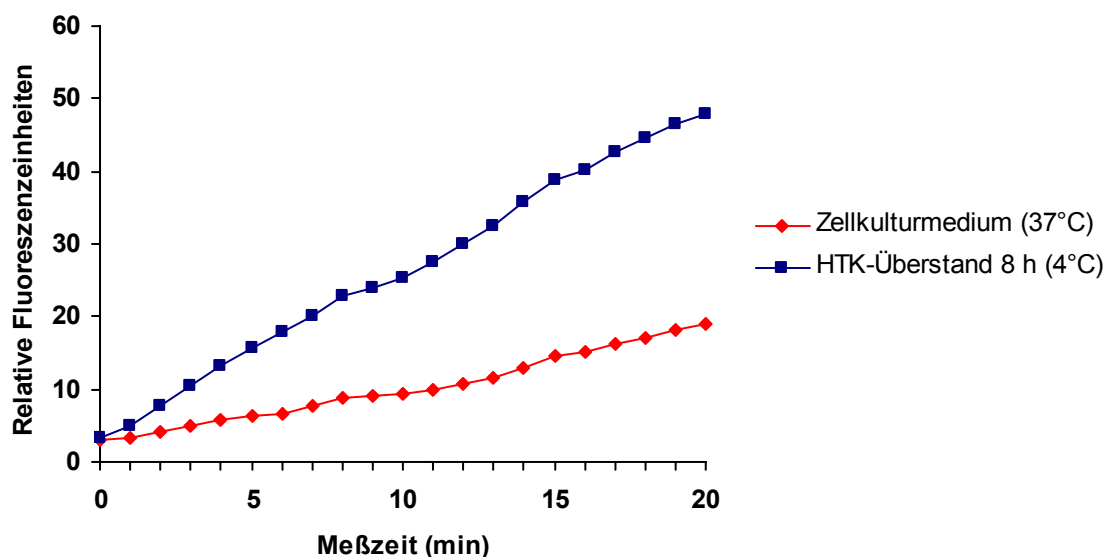
### 4.3 Bestimmung der Proteaseaktivitäten nach Kaltinkubation der Endothelzellen

In Anbetracht der durch den Einsatz von Serin- (PMSF und DCI) und Cysteinproteaseinhibitoren (z-DEVD.fmk) erzielten deutlichen Reduktion des Zelltodes wurde die Proteaseaktivität im Zelllysats bzw. -überstand nach Kaltinkubation der Zellen gemessen. Als Proteasesubstrate dienten hierzu Suc-Ala-Ala-Ala-AMC (ein breites Serinproteasesubstrat), Suc-Leu-Tyr-AMC (ein unspezifisches Cysteinproteasesubstrat), z-Arg-Arg-AMC (zum Nachweis einer Cathepsin B-Aktivität), Ac-DEVD-AMC (ein relativ spezifisches Substrat für den Nachweis einer Caspase 3-Aktivität) und Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, welches sowohl für den Nachweis von Calpainaktivitäten als auch zur Messung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms geeignet ist (siehe Tab. 3).

**Tab. 3. Übersicht über die verwendeten Proteasesubstrate und deren überwiegende Spezifität.** Dargestellt sind die für die Messung der verschiedenen Proteaseaktivitäten verwendeten Substrate (50 µM). Entscheidend für die Bestimmung der Calpainaktivität ist die Differenz zwischen der gemessenen Aktivität mit Calcium und der gemessenen Aktivität ohne Calcium (in Gegenwart von EDTA). Für Einzelheiten zu den Messbedingungen siehe auch Material und Methoden.

Proteasesubstrat	Wird vornehmlich gespalten von
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC; pH 7,5	Proteasom (und Calpainen)
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC; pH 7,25 + Ca <sup>2+</sup>	Calpainen
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC; pH 7,25 + EDTA	(Calpain-Kontrolle)
Suc-Ala-Ala-Ala-AMC	Serinproteasen
Suc-Leu-Tyr-AMC	Cysteinproteasen
z-Arg-Arg-AMC	Cathepsin B
Ac-DEVD-AMC	Caspase 3

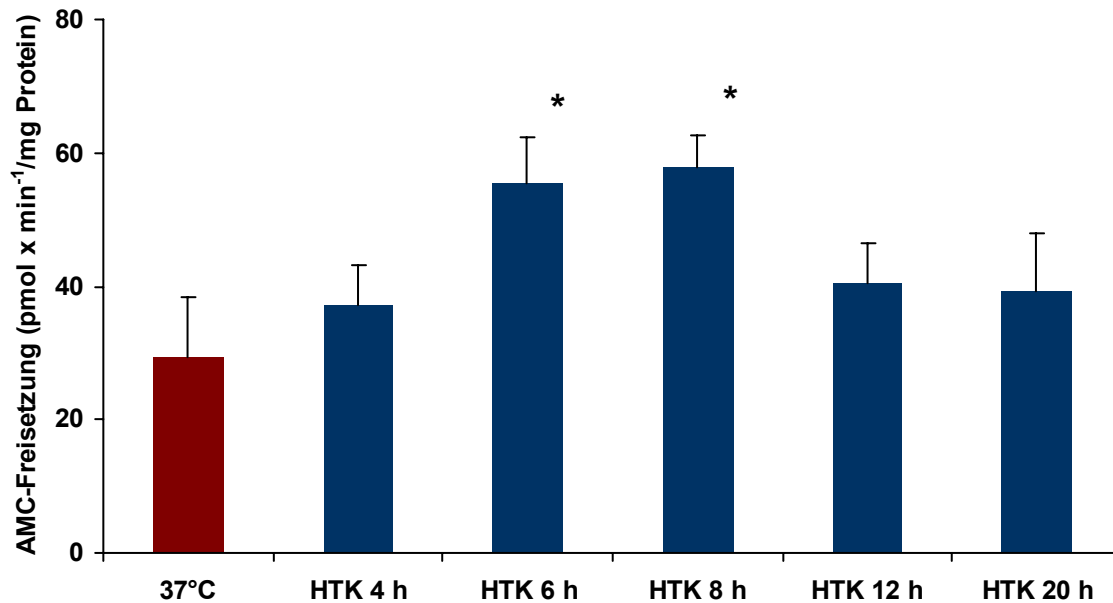
Die Endothelzellen wurden - wie in Kap. 3.4 beschrieben - in den entsprechenden Lösungen kalt inkubiert respektive warm inkubiert (warme Kontrollen). Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Zellüberstand entfernt, und die Zellen wurden lysiert. Die Proteaseaktivität wurde in den Überständen und Lysaten mit Hilfe der oben dargestellten Proteasesubstrate fluorometrisch bestimmt und als AMC-Freisetzung (in relativen Fluoreszenzeinheiten) gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 19). Die Messbedingungen wurden so optimiert, daß ein ausreichend hohes Messsignal vorhanden war und die Messung im linearen Bereich lag. Entscheidend für die Bestimmung der (relativen) Proteaseaktivität war die Steigung der Geraden (also der lineare Bereich der Messung), ausgedrückt als relative Fluoreszenzeinheit pro Zeiteinheit. Durch Verwendung einer AMC-Eichkurve als Standard und Berücksichtigung des Proteingehaltes der Proben (Bradford-Test) ließ sich die absolute Proteaseaktivität als AMC-Freisetzung in  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1}/\text{mg}$  Protein angeben.



**Abb. 19. Beispielhafte Kinetik einer Proteaseaktivitätsmessung mit dem Proteasesubstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC.** Sinusoidale Endothelzellen wurden bei 37°C in Zellkulturmedium inkubiert (warme Kontrolle, roter Graph) bzw. bei 4°C in der Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert (8 h Kaltinkubation, blauer Graph). Dargestellt ist die im Zelllysat (warme Kontrolle) und im HTK-Überstand (Kälteansatz) mit dem Proteasesubstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (50  $\mu\text{M}$ ) gemessene Proteaseaktivität als AMC-Freisetzung in relativen Fluoreszenzeinheiten über 20 Minuten.

#### 4.3.1 Bestimmung der Proteaseaktivität mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC nach Kaltinkubation in HTK-Lösung

Ausgehend von dem guten Schutzeffekt der Serinproteaseinhibitoren DCI und PMSF wurde die Serinproteaseaktivität mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC (50  $\mu$ M) gemessen. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Aktivität nach Kaltinkubation (4°C) in der HTK-Lösung mit einem Maximum nach 8 h Kaltinkubation (Abb. 20).

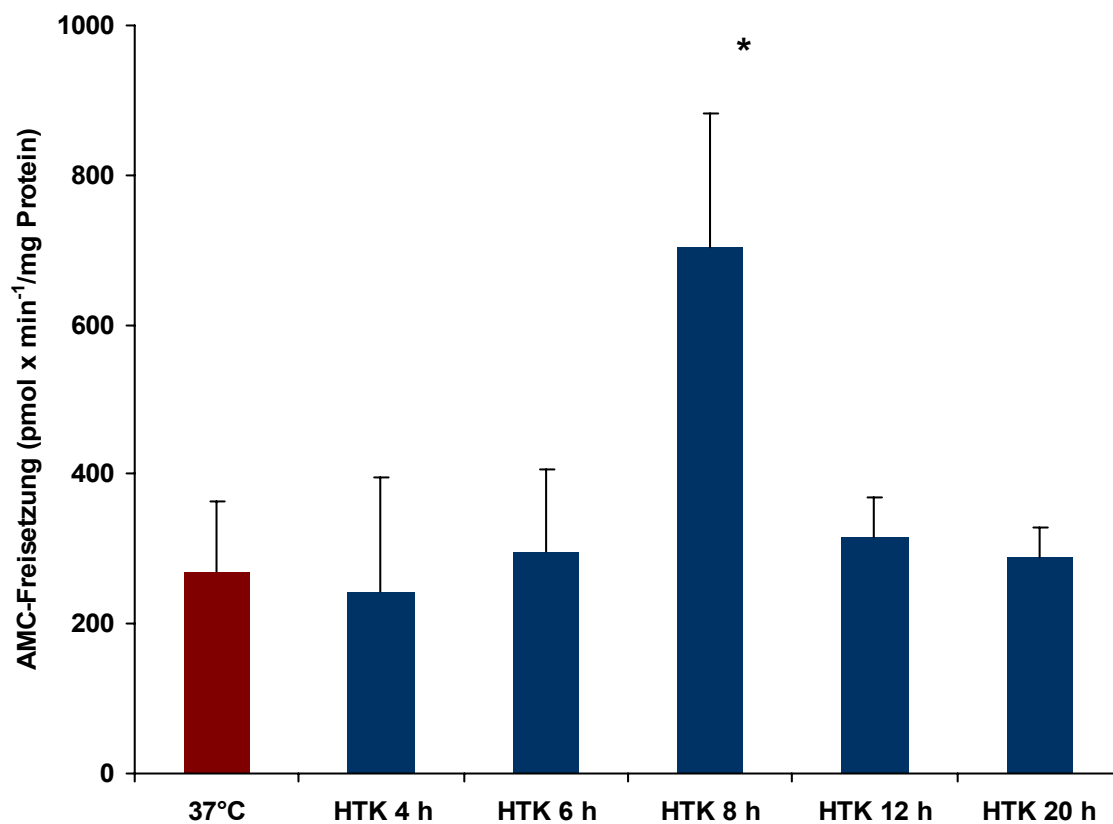


**Abb. 20. Anstieg der mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC gemessenen Proteaseaktivität nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für unterschiedlich lange Zeitperioden bei 4°C in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Zellüberstand entfernt und die Zellen lysiert. Die Proteaseaktivität wurde mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC (50  $\mu$ M) gemessen. Bei den Daten handelt es sich jeweils um Gesamtproteaseaktivitäten (Lysat + Überstand), angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur warmen Kontrolle (37°C),  $p < 0,05$ .

#### 4.3.2 Bestimmung der Proteaseaktivität mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC nach Kaltinkubation in HTK-Lösung

Ebenso wie es bei der Bestimmung der Proteaseaktivität mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC (50  $\mu$ M) nach 6 bzw. 8 h Kaltinkubation in HTK-Lösung zu einem deutlichen Anstieg der Proteaseaktivität kam (Abb. 20), zeigte sich auch bei der Messung der Proteaseaktivität mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (50  $\mu$ M) ein deutlicher Anstieg der Aktivität nach Kaltinkubation in HTK-Lösung (Abb. 21). Dieser zeigte sich nach 8 h Kaltinkubation in HTK-Lösung.

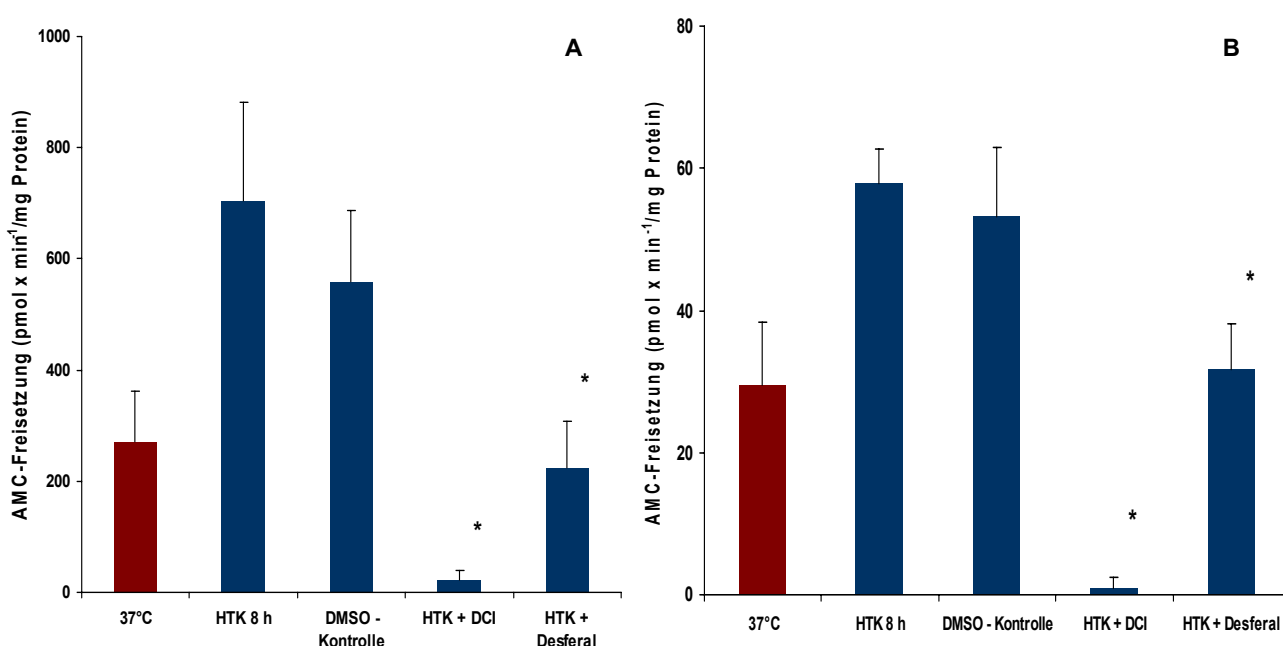


**Abb. 21. Anstieg der mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC gemessenen Proteaseaktivität nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für unterschiedlich lange Zeitperioden bei 4°C in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Zellüberstand entfernt und die Zellen lysiert. Die Proteaseaktivität wurde mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (50  $\mu$ M) gemessen. Bei den Daten handelt es sich jeweils um Gesamtproteaseaktivitäten (Lysat + Überstand), angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur warmen Kontrolle (37°C),  $p < 0,05$ .

### 4.3.3 Effekte des Serinproteaseinhibitors DCI auf die Suc-Ala-Ala-Ala-AMC und Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden Proteaseaktivitäten

Der oben gezeigte Anstieg der über die Proteasesubstrate Suc-Ala-Ala-Ala-AMC (Abb. 20) bzw. Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Abb. 21) gemessenen Proteaseaktivitäten konnte durch den Einsatz des Serinproteaseinhibitors DCI nahezu vollständig gehemmt werden (Abb. 22). DCI (500  $\mu$ M), welches der HTK-Lösung hierbei unmittelbar vor Beginn der Kaltinkubation (4°C) hinzugefügt wurde, vermochte nicht nur den kälteinduzierten Aktivitätsanstieg, sondern auch die physiologische Basisaktivität zu hemmen.

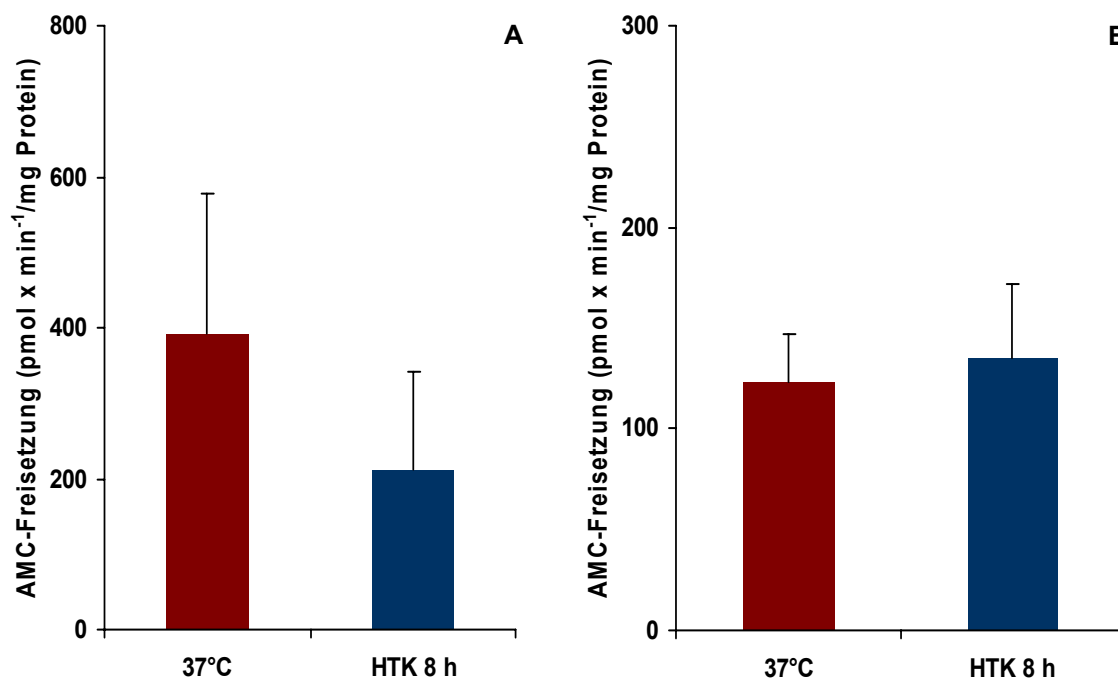


**Abb. 22 . Effekte des Eisenchelators Desferal und des Proteaseinhibitors DCI auf die mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC und Suc-Ala-Ala-Ala-AMC gemessenen Proteaseaktivitäten.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 8 h in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert. Einige Zellen wurden zuvor mit Desferal in Zellkulturmedium vorinkubiert (10 mM, 30 min, 37°C). Anderen wurde direkt vor Beginn der Kaltinkubation 3,4-Dichloroisocumarin (DCI, 500  $\mu$ M) hinzugefügt. Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsmittelkontrolle. Nach 8 h Kaltinkubation wurde der Zellüberstand entfernt, die Zellen lysiert und die Proteaseaktivität gemessen. Als Substrate wurden Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (A) und Suc-Ala-Ala-Ala-AMC (B) verwendet. Gezeigt ist jeweils die Proteaseaktivität (Gesamtaktivität aus Überstand und Lysat) als Mittelwert  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur Inkubation in HTK-Lösung (ohne Zusätze) bzw. zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Kontrolle),  $p < 0,05$ .

#### 4.3.4 Bestimmung der Cathepsin B-Aktivität und der Cysteinproteaseaktivität nach Kaltinkubation in HTK-Lösung

Zeigte sich bei der Messung der Proteaseaktivitäten mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC und Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC ein deutlicher Anstieg der Proteaseaktivitäten nach Kaltinkubation in HTK-Lösung (Abb. 20 und 21), so blieb dieser Anstieg bei der Bestimmung der Cathepsin B- und Cysteinproteaseaktivität aus. Es ließ sich kein Anstieg der mit z-Arg-Arg-AMC (Cathepsin B-Aktivität) und Suc-Leu-Tyr-AMC (Cysteinproteaseaktivität) gemessenen Proteaseaktivitäten nach 8 h Kaltinkubation in HTK-Lösung nachweisen (Abb. 23).

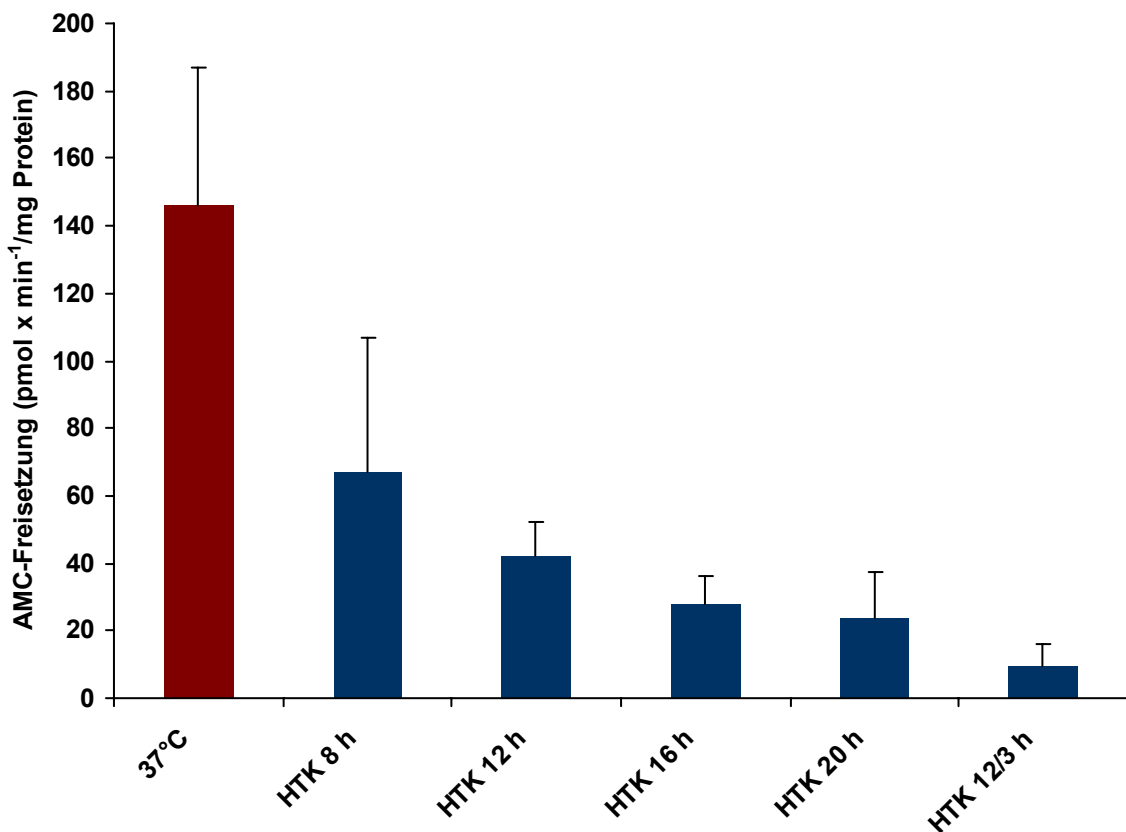


**Abb. 23. Cathepsin B- und Cysteinproteaseaktivität nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 8 h bei 4°C in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen lysiert. Die Cathepsin B-Aktivität wurde mit z-Arg-Arg-AMC (50 µM, A) gemessen, während die Cysteinproteaseaktivität mit Suc-Leu-Tyr-AMC (50 µM) gemessen wurde (B). Bei den Daten handelt es sich jeweils um Gesamtproteaseaktivitäten (Lysat + Überstand), angegeben als Mittelwerte ± SD aus 4 unabhängigen Experimenten.



#### 4.3.5 Bestimmung der Caspase 3-Aktivität nach Kaltinkubation in HTK-Lösung

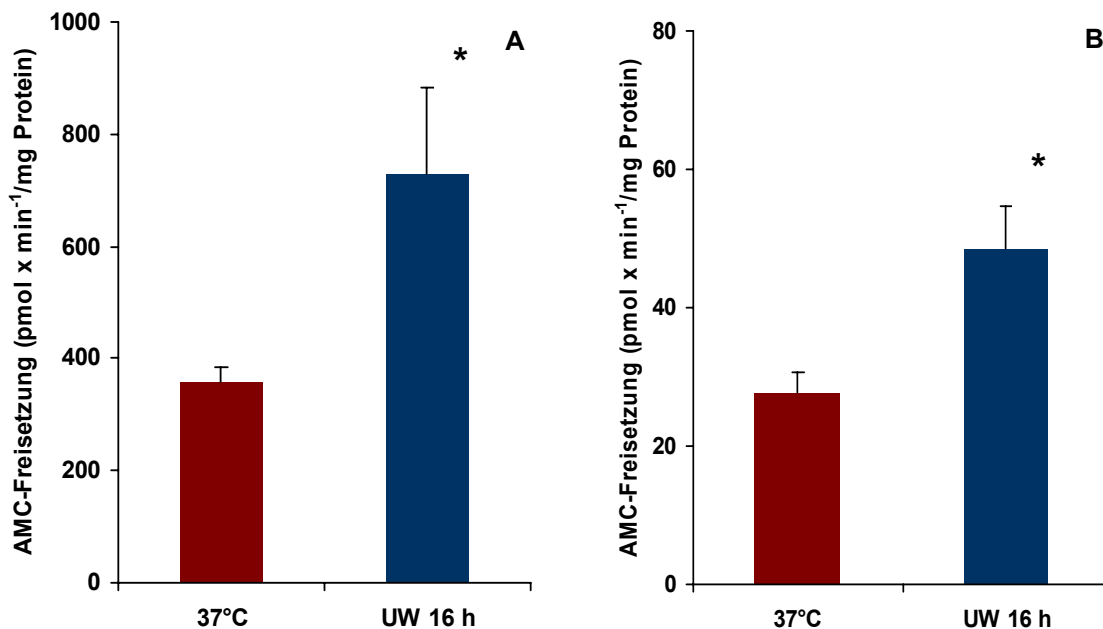
Überraschenderweise fand sich - ausgehend von dem sehr guten Schutzeffekt durch den Caspase 3-Inhibitor z-DEVD.fmk (Abb. 10) - kein Anstieg in der Caspase 3-Aktivität, die mit Ac-DEVD-AMC (50  $\mu$ M) gemessen wurde. Weder nach 8 h reiner Kaltinkubation bei 4°C in der HTK-Lösung, noch zu späteren Zeitpunkten zeigte sich eine erhöhte Proteaseaktivität (Abb. 24). Auch nach 12 h Kaltinkubation mit einer Wiedererwärmung von 3 h (bei längeren Kaltinkubationszeiten in HTK-Lösung mit sukzessiver Wiedererwärmung ist die Zellschädigung bereits soweit fortgeschritten, dass eine Proteaseaktivierung nicht mehr erwartet werden kann, da zu diesem Zeitpunkt die Mehrzahl der Zellen schon tot ist [Abb. 3 und 4] und demzufolge die apoptotische Signalkaskade [und auch eine mögliche Caspaseaktivierung] bereits stattgefunden hat) ließ sich eine erhöhte Caspase 3-Aktivität nicht nachweisen (Abb. 24).



**Abb. 24. Caspase 3-Aktivität nach Kaltinkubation in HTK-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für unterschiedlich lange Zeitperioden bei 4°C in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert. Einige Zellen wurden nach 12 h Kaltinkubation in HTK-Lösung in Zellkulturmedium für 3 h bei 37°C wiedererwärmt (HTK 12/3 h). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Zellüberstand entfernt und die Zellen lysiert. Die Caspase 3-Aktivität wurde mit Ac-DEVD-AMC (50  $\mu$ M) gemessen. Bei den Daten handelt es sich jeweils um Gesamtproteaseaktivitäten (Lysat + Überstand), angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

#### 4.3.6 Bestimmung der Proteaseaktivitäten mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC und Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC nach Kaltinkubation in UW-Lösung

Zeigte sich nach 8-stündiger Kaltinkubation in der HTK-Lösung eine deutliche Aktivitätserhöhung, welche sich mit den Substraten Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC und Suc-Ala-Ala-Ala-AMC messen ließ (Abb. 20 und 21), so konnte ebenfalls eine Erhöhung nach Kaltinkubation in der UW-Lösung beobachtet werden (Abb. 25). Da der Zelltod jedoch nach Kaltinkubation in der UW-Lösung im Vergleich zur HTK-Lösung protrahierter verläuft (Abb. 3), ließ sich diese Aktivitätserhöhung erst nach 16 h Kaltinkubation darstellen.



**Abb. 25. Anstieg der Proteaseaktivitäten nach Kaltinkubation in UW-Lösung.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 16 h bei 4°C in University of Wisconsin-Lösung (UW) inkubiert. Der Zellüberstand wurde entfernt und die Zellen lysiert. Die Proteaseaktivität wurde mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (A) und mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC (B) gemessen. Bei den Daten handelt es sich jeweils um Gesamtproteaseaktivitäten (Lysat + Überstand), angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

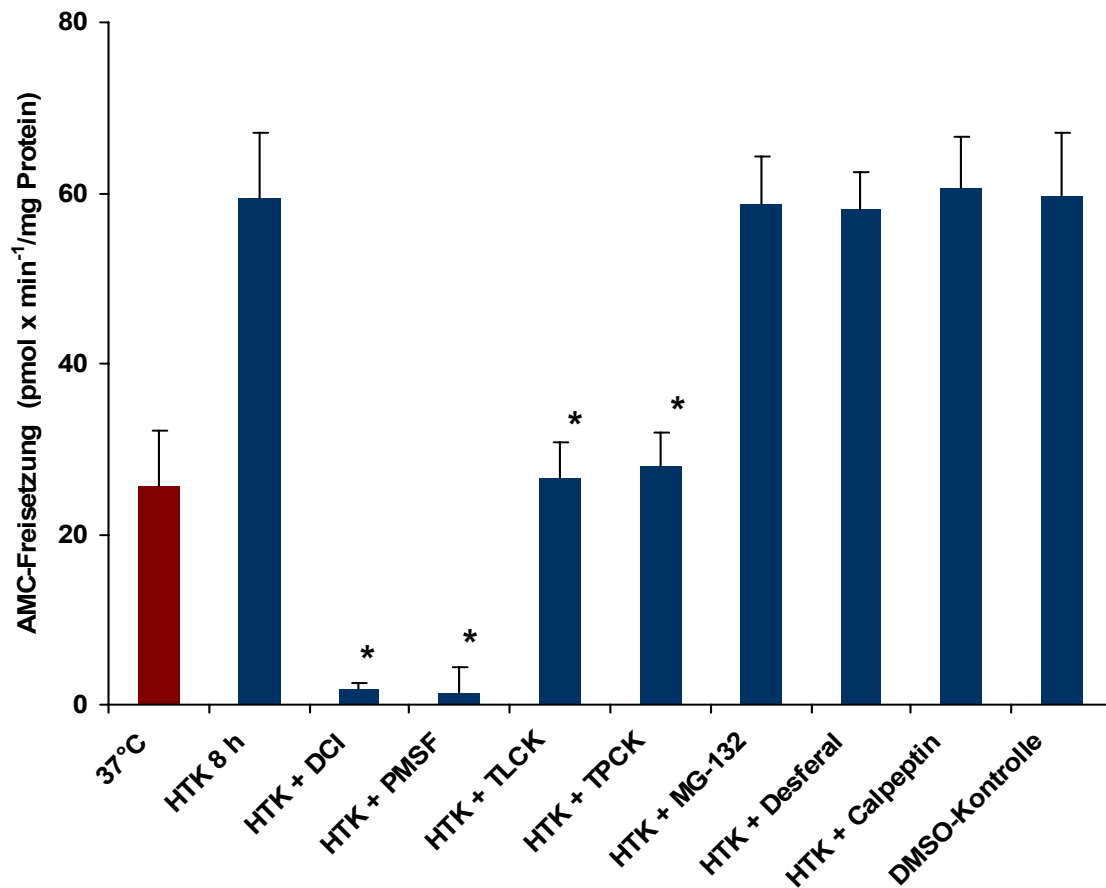
\*signifikant unterschiedlich zur warmen Kontrolle (37°C),  $p < 0,05$ .

#### **4.3.7 Differenzierung der Suc-Ala-Ala-Ala-AMC und Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden Protease**

Die weitere Charakterisierung der Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden und Suc-Ala-Ala-Ala-AMC spaltenden Aktivitäten ergab, dass die Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltende Protease und die Suc-Ala-Ala-Ala-AMC spaltende Protease *nicht* identisch sind.

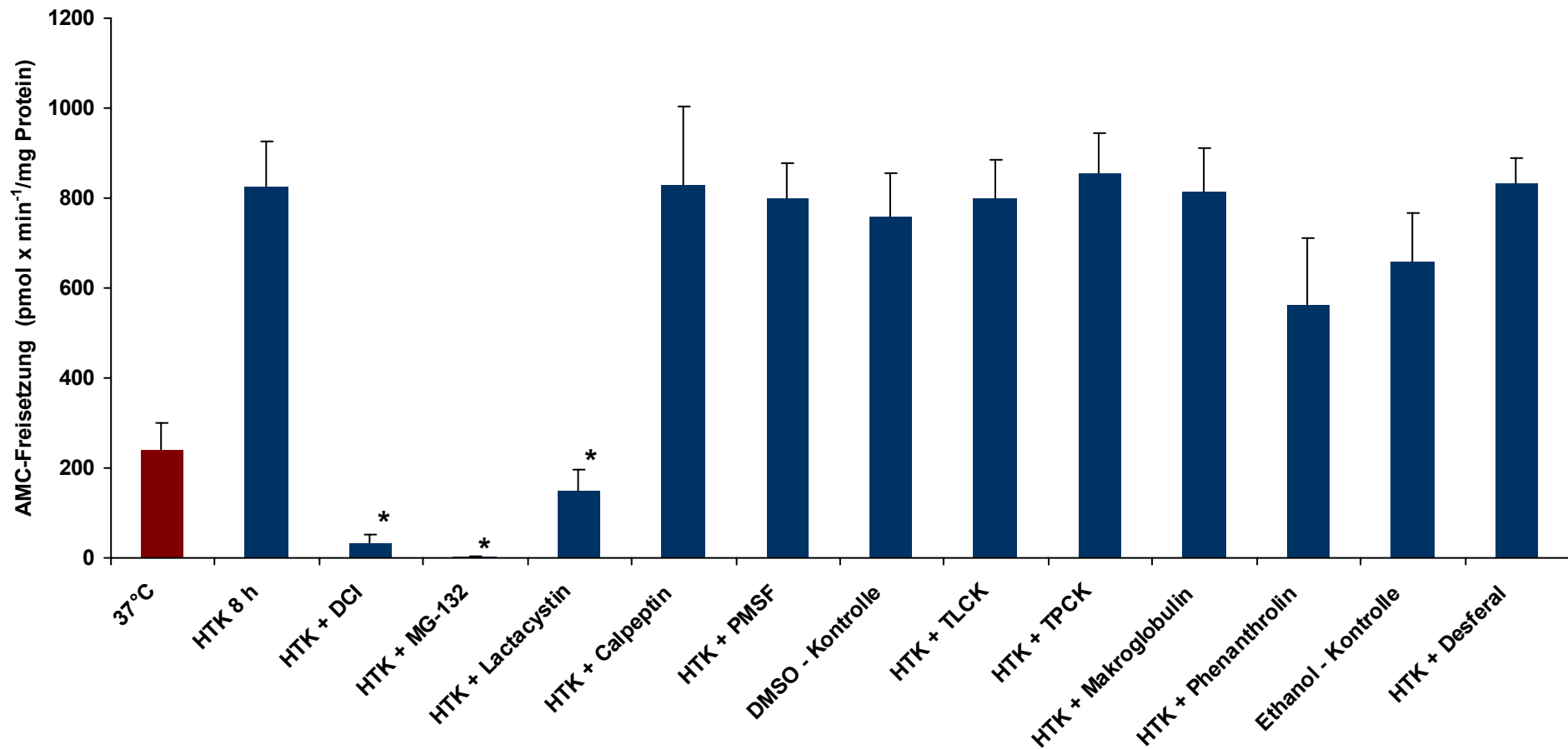
Die Suc-Ala-Ala-Ala-AMC spaltende Aktivität ließ sich durch die Zugabe der Serinproteaseinhibitoren DCI (100 µM) und PMSF (1 mM) zum Proteaseassay (d. h. zum Zellysat bzw. Überstand) völlig hemmen, während durch die Serinproteaseinhibitoren TLCK (10 µM) und TPCK (10 µM) eine Reduktion der Aktivität auf die physiologische Basisaktivität (entsprechend der warmen Kontrolle) erzielt werden konnte (Abb. 26).

Obgleich DCI (100 µM) nach Zugabe zum Proteaseassay auch die Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltende Aktivität zu hemmen vermochte, so zeigten doch die Serinproteaseinhibitoren PMSF (1 mM), TLCK (10 µM) und TPCK (10 µM) - ebenfalls direkt zum Proteaseassay hinzugegeben - keinen hemmenden Einfluß auf diese Proteaseaktivität (Abb. 27).



**Abb. 26. Effekte verschiedener Inhibitoren auf die Suc-Ala-Ala-Ala-AMC spaltende Proteaseaktivität.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 8 h in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) kalt inkubiert (4°C). Der Zellüberstand wurde entnommen und die Zellen lysiert. Den Überständen bzw. Lysaten wurden unmittelbar vor Beginn der Messung die Inhibitoren 3,4-Dichloroisocumarin (DCI, 100 µM), Phosphomethylsulfonylfluorid (PMSF, 1 mM), MG-132 (1 µM), Calpeptin (1 µM, alle in Dimethylsulfoxid, DMSO, gelöst), Tosyl-Lysin-Chloromethylketon (TLCK, 10 µM), Tosyl-Phenylalanin-Chloromethylketon (TPCK, 10 µM) und Desferal (100 µM, alle in A. bidest gelöst) hinzugegeben. Bei den Daten handelt es sich jeweils um Gesamtproteaseaktivitäten (Lysat + Überstand), angegeben als Mittelwerte ± SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur Inkubation in HTK-Lösung (ohne Zusätze) bzw. zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Kontrolle),  $p < 0,05$ .



**Abb. 27. Effekte verschiedener Inhibitoren auf die Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltende Proteaseaktivität.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 8 h in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) kalt inkubiert (4°C). Der Zellüberstand wurde entnommen und die Zellen lysiert. Den Überständen bzw. Lysaten wurden unmittelbar vor Beginn der Messung die Inhibitoren 3,4-Dichloroisocumarin (DCI, 100 µM), MG-132 (1 µM), Lactacystin (40 µM), Calpeptin (1 µM), Phosphomethylsulfonylfluorid (PMSF, 1 mM, alle in Dimethylsulfoxid, DMSO, gelöst), Tosyl-Lysin-Chloromethylketon (TLCK, 10 µM), Tosyl-Phenylalanin-Chloromethylketon (TPCK, 10 µM), α<sub>2</sub>-Makroglobulin (100 µg/ml), Desferal (100 µM, alle in A. bidest gelöst) und 1,10-Phenanthrolin (2 mM, in Ethanol) hinzugegeben. Bei den Daten handelt es sich jeweils um Gesamtproteaseaktivitäten (Lysat + Überstand), angegeben als Mittelwerte ± SD aus 4 unabhängigen Experimenten.

\*signifikant unterschiedlich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO-Kontrolle),  $p < 0,05$ .

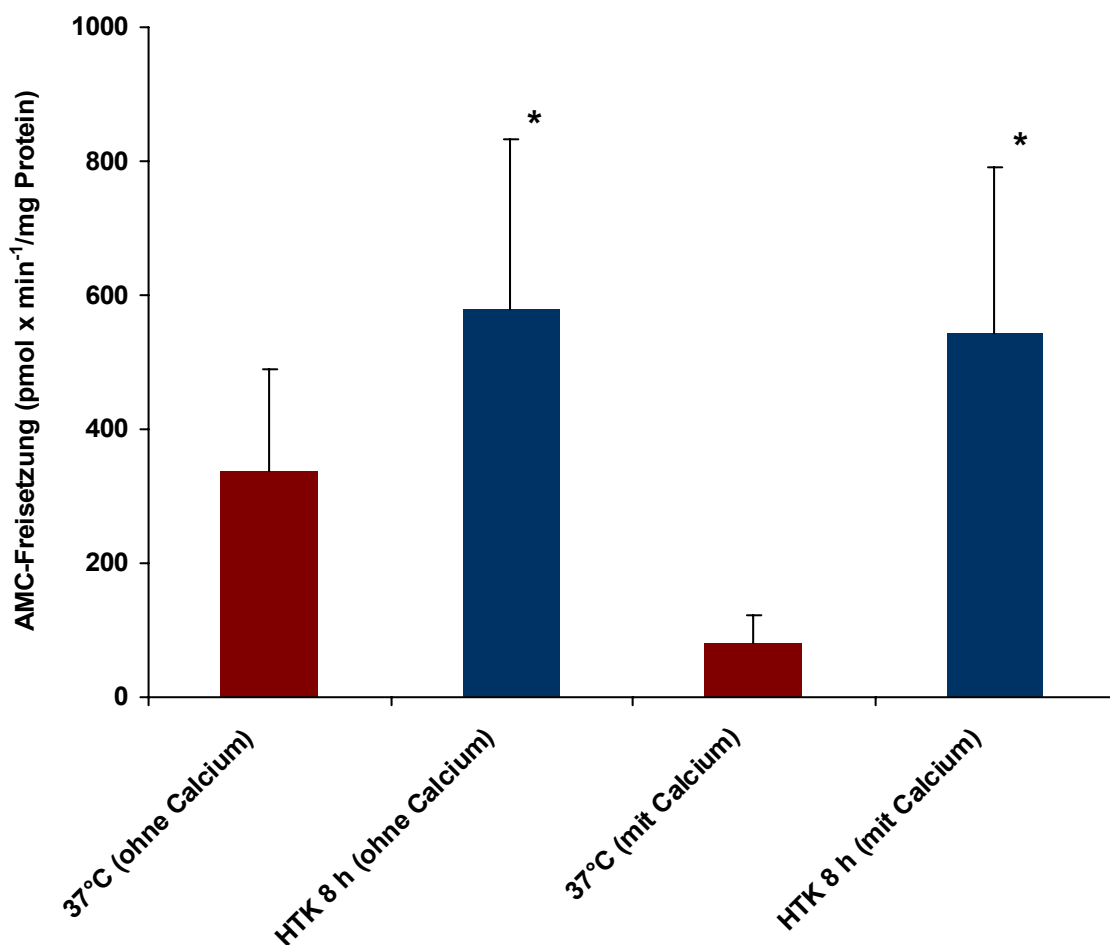
Aufgrund folgender Beobachtungen wurde im Folgenden davon ausgegangen, dass die Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltende Aktivität möglicherweise wichtiger sein könnte als die Suc-Ala-Ala-Ala-AMC spaltende Aktivität:

- Der fehlende protektive Effekt von TLCK und TPCK auf die Zellvitalität (Abb. 14).
- Der nur partielle Schutzeffekt von PMSF in HTK-Lösung bzw. nicht vorhandene Effekt in UW-Lösung (Abb. 15 und 16).
- Die geringere AMC-Freisetzungsrates bei der Spaltung von Suc-Ala-Ala-Ala-AMC und der geringere kälteinduzierte Anstieg (Abb. 20).

Aus den oben angegebenen Gründen wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Identifizierung der Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden Proteaseaktivität gelegt.

#### 4.4 Charakterisierung und Identifizierung der Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden Proteaseaktivität

Aufgrund der Tatsache, dass Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC ein geeignetes Substrat sowohl für Calpaine als auch für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms darstellt, wurde die Aktivität in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Calcium gemessen. Die Zugabe von Calcium (8,5 mM freie Konzentration) führte jedoch nicht zu einer gesteigerten Aktivität (Abb. 28). Somit scheint es sich bei der gemessenen Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden Proteaseaktivität nicht um eine Calpainaktivität zu handeln.



**Abb. 28. Calciumeffekt auf die Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltende Proteaseaktivität.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 8 h in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert (4°C), der Zellüberstand entfernt und die Zellen lysiert. Die Messung erfolgte mit bzw. ohne Ca<sup>2+</sup> (8,5 mM freie Konzentration). Als Ausgangswert dienten Zellen, die unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert wurden (37°C). Die Daten stellen Mittelwerte (Gesamtproteaseaktivitäten aus Überstand und Lysat) ± SD aus 4 unabhängigen Experimenten dar.

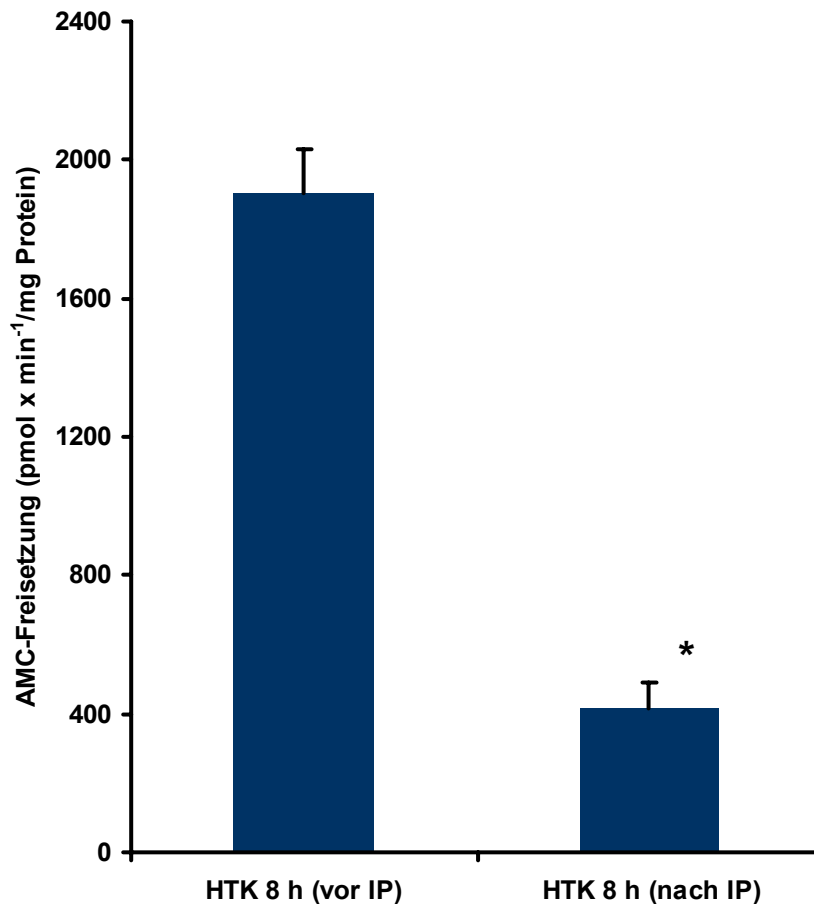
\*signifikant unterschiedlich zur warmen Kontrolle (37°C),  $p < 0,05$ .

Entsprechend des fehlenden Einflusses von Calcium auf die Proteaseaktivität führte auch die Zugabe des Calpaininhibitors Calpeptin (1  $\mu$ M) zum Lysat/Überstand zu keiner Reduktion der gemessenen Aktivität, so dass eine erhöhte Calpainaktivität als Ursache für die erhöhte Spaltung von Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC als unwahrscheinlich gelten kann (Abb. 27).

Das pH-Optimum der gemessenen Proteaseaktivität lag zwischen 7,25 und 8,0 mit einer Restaktivität bei einem pH von 6,0 von weniger als 10% der Ausgangsaktivität, so dass eine Beteiligung von lysosomalen Proteasen (z. B. Cathepsinen) ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht dargestellt). Zusätzlich wurden weitere Proteaseinhibitoren dem Zelllysatz bzw. Überstand hinzugefügt. Ähnlich wie TLCK, TPCK und PMSF keinen Effekt auf die Aktivität hatten (Abb. 27), so hatten auch die Matrixmetalloproteaseinhibitoren  $\alpha_2$ -Makroglobulin und 1,10-Phenanthrolin keinen Effekt (Abb. 27). Dennoch wurde eine signifikante Aktivitätshemmung nicht nur durch DCI erzielt (s. o.), sondern auch durch die Proteasominhibitoren MG-132 und Lactacystin (Abb. 27). Diese Daten sprechen dafür, dass es sich bei der Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden Proteaseaktivität um die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms handeln könnte.

Von dieser Annahme ausgehend, wurde der  $K_m$ -Wert der Protease für das Substrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC bestimmt. Die Affinität für dieses Substrat war mit einem  $K_m$ -Wert von ungefähr 25  $\mu$ M hoch und entsprach damit in etwa den aus der Literatur bekannten Werten für das Proteasom (40-58  $\mu$ M) (Reidlinger et al., 1997; Gardner et al., 2000). Die zusätzliche Messung des  $K_i$ -Wertes für MG-132 ergab einen Wert von ungefähr 25 nM und war somit ebenfalls in einem Bereich, der in der Literatur vorgeschlagen wird (Lee & Goldberg, 1998). Insgesamt waren diese Werte, die die Hypothese einer Beteiligung des Proteasoms - genauer seiner Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität - weiter unterstützten. Diese Hypothese wurde schließlich durch eine Immunopräzipitation des Proteasoms endgültig bestätigt: nach der Immunopräzipitation des Proteasoms zeigte sich nur noch eine geringe Restaktivität, d. h. verbleibende Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC-Spaltung (Abb. 29).

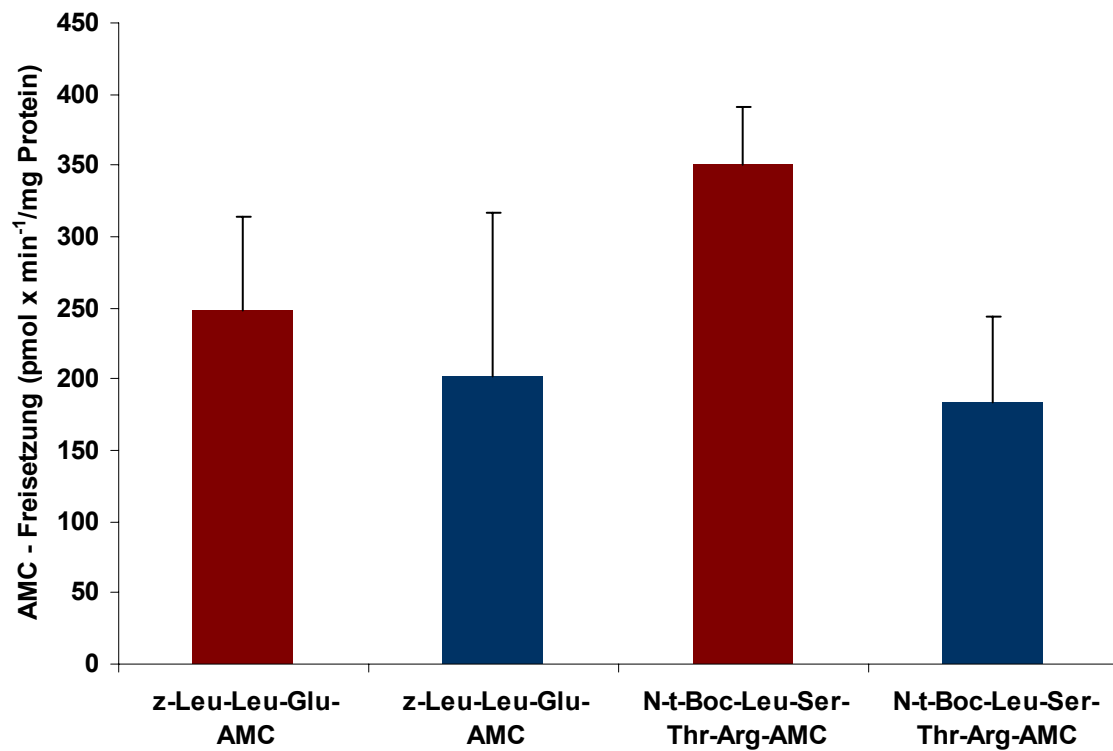




**Abb. 29. Immunopräzipitation des Proteasoms.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 8 h bei 4°C in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Zellen lysiert und die Aktivität mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (50 µM) gemessen. Ein Teil der Proben wurde zur Immunopräzipitation (IP) des Proteasoms mit einem Anti-20S-Proteasomantikörper versetzt, der Protein-Antikörper-Komplex mit Protein A Sepharose CL-4B inkubiert und die Sepharose schließlich durch Zentrifugation entfernt. Der verbliebene Überstand wurde jeweils für die Messung der Proteaseaktivität genutzt (s. o.). Die Daten zeigen jeweils Gesamtaktivitäten (Zellüberstand und Lysat) aus 3 unabhängigen Experimenten, angegeben als Mittelwerte ± SD.

\*signifikant unterschiedlich zur mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC gemessenen Proteaseaktivität vor Immunopräzipitation,  $p < 0,05$ .

Die Bestimmung der anderen Proteasomaktivitäten erfolgte mit den Substraten *N*-t-Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC und z-Leu-Leu-Glu-AMC, beide bekannte Substrate zur Messung der Trypsin-ähnlichen bzw. Peptidylglutamyl-Peptid-Hydrolase-Aktivität. Es zeigte sich hierbei jedoch nach 8 h Inkubation in HTK-Lösung (4°C) kein signifikanter Anstieg dieser Teilaktivitäten des Proteasoms (Abb. 30). Dies mag auf den ersten Blick verwunderlich sein, weil in der Literatur keine isolierte Aktivierung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität bekannt ist. Deshalb ist dieses Ergebnis möglicherweise auf die erhöhte Sensitivität der Trypsin-ähnlichen Aktivität und der Peptidylglutamyl-Peptid-Hydrolase-Aktivität auf oxidativen Stress zurückzuführen (Conconi & Friguet, 1997).



**Abb. 30. Messung der Trypsin-ähnlichen Aktivität und der Peptidylglutamyl-Peptid-Hydrolase-Aktivität des Proteasoms.** Sinusoidale Endothelzellen wurden für 8 h in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert (4°C). Der Überstand wurde entnommen, die Zellen lysiert und die Proteaseaktivitäten gemessen. Für die Messung der Trypsin-ähnlichen Aktivität diente *N*-t-Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-AMC und für die Peptidylglutamyl-Peptid-Hydrolase-Aktivität z-Leu-Leu-Glu-AMC. Die Daten zeigen die Gesamtaktivitäten als Mittelwerte  $\pm$  SD aus 4 unabhängigen Versuchsansätzen.

#### 4.6 Eisenabhängigkeit der Proteaseaktivierung

Die Vorinkubation der Endothelzellen mit dem Eisenchelator Desferal (10 mM, 30 min, 37°C) vor der Kaltinkubation (4°C) in der HTK-Lösung reduzierte die Aktivität der Chymotrypsin-ähnlichen Untereinheit des Proteasoms auf den Ausgangswert der warmen Kontrollen. Anders ausgedrückt: Desferal verhindert den kälteinduzierten Anstieg der Proteasomaktivität komplett (Abb. 22A). Die Kontrollen zeigten, dass die Zugabe von Desferal (100 µM, eine Konzentration, die die erreichte intrazelluläre Konzentration dieser schwer membrangängigen Substanz wahrscheinlich eher übertrifft (Petrat et al., 1999)) direkt zum Zellüberstand bzw. Lysat keinen Effekt auf die Proteasomaktivität hatte (Abb. 27). Somit übt das Eisen seinen Einfluss eher auf die *Proteasomaktivierung* als auf die *Proteasomaktivität* aus.

Auch die mit Suc-Ala-Ala-Ala-AMC gemessene Serinproteaseaktivierung zeigte eine Eisenabhängigkeit und konnte durch den Einsatz von Desferal gehemmt werden (Abb. 22B). Die Aktivität selbst ließ sich jedoch - wie bei der Proteasomaktivität - durch Desferal nicht beeinflussen (Abb. 26).

## 5. Diskussion

### ***Kälteinduzierte Apoptose sinusoidaler Endothelzellen nach Kaltinkubation in HTK-Lösung***

Die kälteinduzierte Apoptose sinusoidaler Endothelzellen (SEC) ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht nur nach Kaltinkubation in Zellkulturmedium und UW-Lösung, sondern auch nach der Kaltinkubation in HTK-Lösung nachweisen (Abb. 3-5). Bei der Phasenkontrastmikroskopie zeigten sich nach der Sequenz Kaltinkubation/Wiedererwärmung eine deutliche Schrumpfung der SEC und der Zellkerne sowie typische „apoptotic bodies“ (Abb. 4). Auch die mit den Fluoreszenzfarbstoffen Propidiumjodid und H33342 dargestellten Kernveränderungen nach der Sequenz Kaltinkubation/Wiedererwärmung wiesen apoptotische Veränderungen im Sinne einer Kernkondensation auf (Abb. 5). Außerdem kam es nach der Kaltinkubation in der HTK-Lösung zu einer Lipidperoxidation (Abb. 7), so dass die kälteinduzierte Apoptose SEC in dieser Lösung wahrscheinlich ebenfalls - wie es in der UW-Lösung der Fall ist - über eine eisenabhängige Freisetzung von ROS vermittelt wird. Da die nach Kaltinkubation in der HTK-Lösung auftretende Lipidperoxidation eisenabhängig ist, ließ sich diese durch den Eisenchelator Desferal - ähnlich nach der Kaltinkubation in UW-Lösung (Rauen et al., 1997) - signifikant senken (Abb. 7). Die kälteinduzierte Apoptose nach Kaltinkubation in den Konservierungslösungen HTK und UW wies - trotz ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung (s. Kap. 3.2) - große Ähnlichkeit auf. Bei beiden Konservierungslösungen kam es zu einer deutlichen Akzeleration bzw. Verstärkung der kälteinduzierten Apoptose mit besonderer Ausprägung in der HTK-Lösung im Vergleich zum Zellkulturmedium (Abb. 3). Die Erklärung für dieses Phänomen bleibt vorerst unklar; sowohl in den Konservierungslösungen als auch im Zellkulturmedium ist die kälteinduzierte Apoptose eisenabhängig (wie der fast komplette Schutzeffekt durch den Eisenchelator Desferal zeigte, Abb. 6; in Zellkulturmedium: Rauen et al., 1999). Möglicherweise trägt jedoch die in der HTK-Lösung vorhandene hohe Histidin-Konzentration (198 mM) entscheidend zur Verstärkung der kälteinduzierten Apoptose sinusoidaler Endothelzellen in dieser Lösung bei (Klempt, Rauen, unveröffentlichtes Ergebnis).

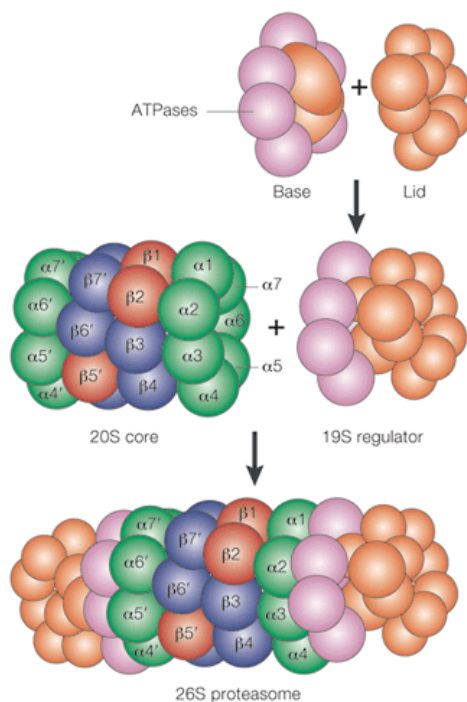
## ***Beteiligung von zwei unterschiedlichen Proteasen an der kälteinduzierten Apoptose***

Die kälteinduzierte Apoptose in den Konservierungslösungen HTK und UW geht nicht nur einher mit der eisenabhängigen Freisetzung von ROS und einer konsekutiven Lipidperoxidation, sondern auch mit einer Aktivierung von Proteasen nach der Kaltinkubation in den Konservierungslösungen HTK und UW. Der eindeutige Nachweis einer Proteasebeteiligung an der kälteinduzierten Apoptose von SEC ließ sich im Wesentlichen durch zwei Befunde führen: Zum einen kam es durch den Einsatz des Inhibitors von Serinproteasen und des Proteasoms (einem multikatalytischen, cytosolischen Enzymkomplex) 3,4-Dichloroisocumarin (DCI) zu einem deutlichen, signifikanten Schutzeffekt (Abb. 17 und 18). Dabei zeigte sich dieser Schutzeffekt von DCI nicht nur in Bezug auf die Vitalität der Zellen (Abb. 17 und 18), sondern auch im Hinblick auf die apoptotischen morphologischen Veränderungen, die durch den Inhibitor weitgehend unterdrückt wurden (Abb. 4), sowie der signifikanten Verminderung der Lipidperoxidation (Abb. 7). Zum anderen konnte eine erhöhte Proteaseaktivität nach der Kaltinkubation in den Konservierungslösungen HTK und UW nachgewiesen werden.

Die Kaltinkubation in diesen Konservierungslösungen führte zur Aktivierung zweier Proteasen, einer Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden und einer Suc-Ala-Ala-Ala-AMC spaltenden Protease (Abb. 20 und 21). Bei der Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltenden Protease scheint es sich überraschenderweise um eine Untereinheit des Proteasoms zu handeln, genauer gesagt, um seine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität. Dies lässt sich im Wesentlichen aus der erzielten Aktivitätshemmung durch die Proteasominhibitoren MG-132 und Lactacystin und der geringen Restaktivität nach Immunopräzipitation mit einem Anti-20S-Proteasom Antikörper ableiten (Abb. 27 und 29). Bei der Suc-Ala-Ala-Ala-AMC spaltenden Protease handelt es sich um eine Serinprotease von bisher unbekannter Bedeutung für die kälteinduzierte Apoptose sinusoidaler Rattenleberendothelzellen.

## Aufbau und Funktion des Proteasoms

Bei dem Proteasom handelt es sich um einen ubiquitär vorkommenden, cytosolisch lokalisierten Multienzymkomplex (700 kDa), dessen Aufgabe vornehmlich in der Degradation geschädigter Proteine bzw. Peptide zu sehen ist (Pals-Rylaarsdam, 1998; Tanaka & Chiba, 1998). Damit bildet das Proteasom die zweite wichtige Abbaustätte von Proteinen und Peptiden nebst den lysosomalen Proteasen (z. B. den Cathepsinen). Das Proteasom besteht zum einen aus der so genannten 20S-Untereinheit, die gleichzeitig das katalytische Zentrum des Enzymkomplexes bildet, und zwei so genannten 19S-Untereinheiten, die zusammen mit der 20S-Untereinheit die 26S-Einheit des Proteasoms ausmachen (Tanaka & Chiba, 1998; Myung et al., 2001). Die beiden 19S-Untereinheiten, die sich an beiden Enden des 20S-Proteasoms befinden, enthalten eine Vielzahl von ATPasen und können in einem ATP-abhängigen Prozess Ubiquitin-markierte Peptide und Proteine erkennen, diese deubiquitinieren und die abzubauenen Peptide/Proteine in das katalytische 20S-Zentrum einschleusen (Pals-Rylaarsdam, 1998; Tanaka & Chiba, 1998). Neben diesem energieverbrauchenden Ubiquitin-abhängigen Weg ist das 20S-Zentrum wahrscheinlich auch in der Lage, Peptide und Proteine allein ohne die 19S-Untereinheiten energieunabhängig abzubauen (Tanaka & Chiba, 1998; Shringarpure et al., 2001).



**Abb. 31. Aufbau des Proteasoms.** Das 20S-Proteasom besteht aus 2 äußeren α-Ringen und 2 inneren β-Ringen, die alle jeweils aus 7 Untereinheiten bestehen. An beiden Enden der 20S-Einheit lagern sich die beiden 19S-Untereinheiten mit ihren ATPase-Aktivitäten an.

Die Abbildung wurde der folgenden Website mit Einverständnis der Website-Betreiber entnommen: <http://xoomer.virgilio.it/medicine/metabolism.htm>

Das katalytisch aktive 20S-Zentrum besteht aus zwei äußeren  $\alpha$ -Ring und zwei inneren  $\beta$ -Ring, so dass die Form einem Zylinder gleicht (DeMartino & Slaughter, 1999). Jeder dieser Ringe besteht aus sieben Untereinheiten. Eine katalytische Aktivität wird in der Literatur gegenwärtig nur den  $\beta$ -Untereinheiten zugesprochen. Es sind dies wenigstens drei katalytische Aktivitäten in jedem  $\beta$ -Ring, denen allen gemeinsam die Aminosäure Threonin im jeweils aktiven Zentrum ist (DeMartino & Slaughter, 1999). Gelegentlich werden auch noch zwei weitere aktive Zentren diskutiert (auf die hier im Weiteren nicht näher eingegangen werden soll), deren Bedeutung bisher jedoch nicht geklärt werden konnte (Myung et al., 2001). Die einzelnen Aktivitäten werden (zum Teil historisch bedingt, zum Teil wegen ihrer Substratspezifitäten) als Trypsin-ähnliche, Chymotrypsin-ähnliche und Peptidylglutamyl-Peptid-Hydrolase-Aktivität bezeichnet.

### ***Beteiligung des Proteasoms an apoptotischen Prozessen***

Eine Beteiligung des Proteasoms wurde bisher in verschiedenen Apoptosemodellen postuliert, jedoch nicht im Rahmen der Konservierungsschädigung der Leber. So scheint es bei der glucocorticoidinduzierten Apoptose von Thymozyten zu einer Aktivierung des Proteasoms vor dem Auftreten der so genannten „Mitochondrial Permeability Transition“ (mitochondrialer Permeabilitätsübergang, MPT) mit nachfolgendem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und einer späteren konsekutiven Aktivierung von Caspasen zu kommen (Hirsch et al., 1998). Die Proteasomaktivierung in diesem Apoptosemodell schien von essentieller Bedeutung für den Zelltod zu sein, da der Einsatz der Proteasominhibitoren Lactacystin (einem irreversiblen Proteasominhibitor, dem gegenwärtig die höchste Spezifität zugeschrieben wird (Fenteany & Schreiber, 1998)) und MG-132 (ein reversibler, auf einem Peptidaldehyd basierender Inhibitor des Proteasoms (Myung et al., 2001)) zu einer deutlichen Reduktion des Zelltodes führte. Hingegen konnte durch den Einsatz von Caspaseinhibitoren, die keinen direkten Effekt auf das Proteasom hatten, der Zelltod nicht verhindert werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine andere Arbeitsgruppe, die ebenfalls von einer Proteasomaktivierung im Rahmen der Thymozytenapoptose berichtete (Grimm et al., 1996). Auch hier ließ sich durch den Einsatz von Proteasominhibitoren wie MG-132 eine glucocorticoid- bzw. strahlungsinduzierte Apoptose hemmen, während Caspaseinhibitoren keinerlei Wirkung zeigten. Dennoch gibt es gegenwärtig auch kontroverse Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung von Proteasominhibitoren im Rahmen der Apoptose. An

anderen Zellen wie differentiellen leukämischen Zellen, malignen Zellen der Magenschleimhaut, Gliomzellen oder kultivierten corticalen Neuronen führte der Einsatz von Proteasominhibitoren nicht zu einer Zellprotektion, sondern gar zu einer Induktion des apoptotischen Zelltodes, der zum Teil auch über eine Aktivierung von Caspasen verlief (Shinohara et al., 1996; Naujokat et al., 2000; Qiu et al., 2000; Wagenknecht et al., 2000; Fan et al., 2001). Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass die pro- und antiapoptotischen Effekte der Proteasominhibitoren von deren Konzentration selbst abhängen (Lin et al., 1998). Bei einer MG-132-Konzentration von 200 nM soll es zu einem protektiven Effekt gekommen sein, während eine Konzentration von 20 µM zu einer Apoptoseinduktion führte. Somit scheint gegenwärtig die Bedeutung des Proteasoms im apoptotischen Zelltod von den verschiedenen Apoptosemodellen bzw. Zelltypen abhängig zu sein (Wojcik, 1999).

In vielen Apoptosemodellen, in denen die Beteiligung des Proteasoms (sowohl in pro- als auch in antiapoptotisch wirkender Funktion) nachgewiesen werden konnte, blieb jedoch unklar, welche Peptide bzw. Proteine im Einzelnen durch das Proteasom gespalten werden. Als Kandidaten, die für einen Abbau durch das (aktivierte) Proteasom in Frage kommen, werden u. a. Bcl-2 und das „heat shock protein“ (Hsp) 72 diskutiert. So konnte bei menschlichen Endothelzellen gezeigt werden, dass durch die Proteasominhibierung der (proteasomvermittelte) Bcl-2-Abbau gehemmt und somit die Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induzierte Apoptose verhindert werden konnte (Dimmeler et al., 1999). Ferner konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition des Proteasoms der Abbau von Hsp 72 gehemmt wurde. Es kam in Folge dessen zu einem Überwiegen dieses antiapoptotisch wirkenden Faktors gegenüber der (proapoptotisch wirkenden) Jun N-terminalen Kinase (JNK) mit konsekutiver Hemmung der Apoptose (Meriin et al., 1998). Letztlich muss jedoch die Frage, wo das Proteasom in der apoptotischen Signalkaskade im Detail eingreift, in vielen Fällen unbeantwortet bleiben.

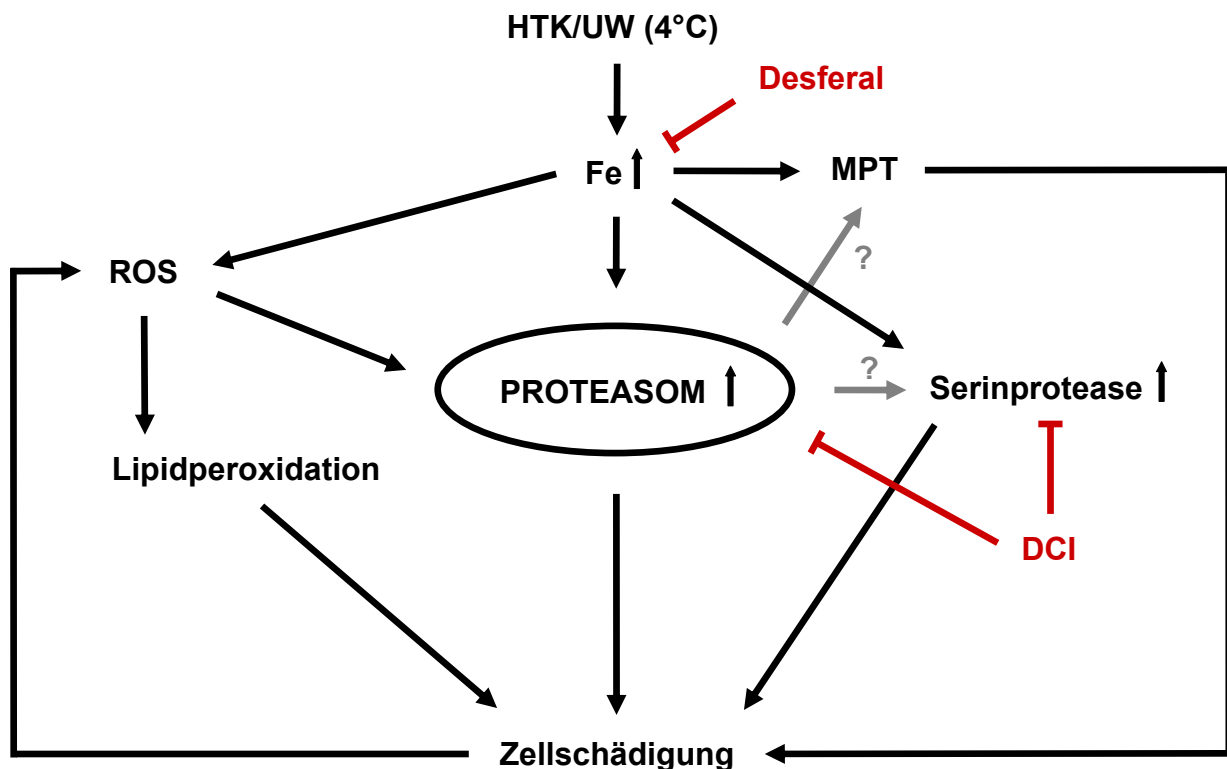
### ***Beteiligung des Proteasoms an der kälteinduzierten Apoptose***

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigte Proteasomaktivierung bei der kälteinduzierten Apoptose von kultivierten sinusoidalen Rattenleberendothelzellen (Abb. 21 und 25A) war eisenabhängig (Abb. 32). Wie bereits dargestellt, wird die kälteinduzierte Apoptose über eine Freisetzung von ROS auf dem Boden eines kälteinduzierten Anstiegs des chelatisierbaren Eisens vermittelt (Rauen et al., 1999; Rauen et al., 2000; Kerkweg et al., 2002). Die Vorinkubation der Zellen mit dem Eisenchelator Desferal verhinderte die kälteinduzierte Aktivierung des Proteasoms



(Abb. 22A), hatte aber keinen direkten Einfluß auf die Aktivität des Proteasoms (Abb. 27). Daraus läßt sich schlussfolgern, dass die Proteasomaktivierung als eine Konsequenz aus der Bildung von ROS aufzufassen ist. Diese führen u. a. zur Schädigung zellulärer Proteine, und es ist bekannt, dass das Proteasom u. a. für den Abbau dieser oxidativ geschädigten Proteine verantwortlich ist (Shringarpure et al., 2001).

Aus dem oben Dargestellten läßt sich folgern, dass der kälteinduzierte Anstieg des chelatisierbaren Eisens entweder direkt oder aber über die Bildung von ROS (und konsekutiver Proteinoxidation) zur Aktivierung des Proteasoms führt (Abb. 32). Das aktivierte Proteasom kann seinerseits direkt zur Zellschädigung beitragen, und die im Rahmen dieser Zellschädigung vermehrt auftretenden ROS können die Proteasomaktivierung noch verstärken. So ließ sich auch durch den Einsatz des Proteaseinhibitors DCI (bzw. PMSF) die proteasomvermittelte (bzw. serinproteasevermittelte) ROS-Freisetzung und als Konsequenz dessen die nach Kaltinkubation in HTK-Lösung auftretende Lipidperoxidation signifikant hemmen (Abb. 7). Neben dieser direkten durch das Proteasom vermittelten Zellschädigung könnte das Proteasom auch zu der während der Wiedererwärmung der SEC auftretenden MPT (Kerkweg et al., 2003) beitragen, wie im Modell der glucocorticoidinduzierten Apoptose von Thymozyten beschrieben (Hirsch et al., 1998). Ausgehend von Befunden in der Literatur, die von einer proteasomvermittelten Aktivierung verschiedener Proteasen wie z. B. von Caspasen (Wojcik, 1999) und Serinproteasen (Wu et al., 1999) berichten, könnte eine weitere Funktion des Proteasoms innerhalb der kälteinduzierten Apoptose darin bestehen, die - ebenfalls eisenabhängig aktivierte - Serinprotease unmittelbar zu aktivieren. Durch diese proapoptotisch wirkende Kaskade könnte das Proteasom eine entscheidende Schnittstelle innerhalb des Apoptosegeflechtes einnehmen (Abb. 32).



**Abb. 32. Eisenabhängigkeit der Proteaseaktivierung.** Die Kaltinkubation sinusoidaler Endothelzellen in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) und University of Wisconsin-Lösung (UW) führt zu einem Anstieg des chelatisierbaren Eisenpools mit der Bildung und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese führen u. a. über eine Lipidperoxidation zur (während der Wiedererwärmung der Zellen im Vollbild auftretenden) apoptotischen Zellschädigung, der kälteinduzierten Apoptose. Der Anstieg des chelatisierbaren Eisenpools führt nicht nur zur Freisetzung von ROS, sondern auch zur „Mitochondrial Permeability Transition“ (mitochondrialer Permeabilitätsübergang, MPT), die ihrerseits entscheidend zum Zelltod beiträgt. Von zentraler Bedeutung für die kälteinduzierte Apoptose ist die eisenabhängige Aktivierung des Proteasoms, die sowohl direkt über das Eisen als auch über ROS vermittelt werden kann. Darüber hinaus führt die Erhöhung des chelatisierbaren Eisens auch zur Aktivierung einer weiteren Protease, einer unbekannten Serinprotease, die zwar ebenfalls zur Zellschädigung beiträgt, deren Bedeutung im Rahmen der Apoptose, verglichen mit der des Proteasoms, jedoch als geringer einzuschätzen ist. Möglicherweise ist das Proteasom nicht nur in der Lage direkt zellschädigend zu wirken, sondern es könnte auch indirekt über eine MPT-Induktion und eine Serinproteaseaktivierung zum Zelltod beitragen (diese Wege sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet). Aus dem oben dargestellten Schema ergibt sich, dass die kälteinduzierte Apoptose an verschiedenen Stellen durch Inhibitoren beeinflusst werden kann: zum einen durch Chelatisierung des Eisens mit Desferal, zum anderen durch eine Hemmung der Proteasen, insbesondere des Proteasoms, durch 3,4-Dichloroisocumarin (DCI). Beide Ansätze senken das Ausmaß der Zellschädigung signifikant.

### ***Beteiligung von Serinproteasen an apoptotischen Prozessen***

Wie beim Proteasom ist auch eine Beteiligung von Serinproteasen an der Konservierungsschädigung der Leber nicht beschrieben. Dennoch gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Serinproteasen in anderen Apoptosemodellen. Der Einsatz der Serinproteaseinhibitoren DCI, PMSF und TPCK bei der dexamethasoninduzierten Apoptose von Thymozyten vermochte sowohl die apoptotischen, morphologischen Veränderungen (Zellschrumpfung, Kernfragmentation usw.) als auch die internucleosomale DNA-Fragmentation zu verhindern (Weaver et al., 1993). Allerdings führte die Verwendung dieser Inhibitoren nicht zu einer Reduktion des Zelltodes. Bei der hypoxieinduzierten Apoptose von Tubuluszellen in der Rattenniere scheint es nach der Freisetzung von Cytochrom c über eine Aktivierung von Serinproteasen schließlich zur Caspaseaktivierung zu kommen. Diese ließ sich durch Serinproteaseinhibitoren wie TPCK hemmen und führte so zu einer verminderten Zellschädigung, während die Verwendung von DCI keinen Effekt zeigte (Dong et al., 2000). In beiden hier zitierten Arbeiten wurde jedoch eine erhöhte Serinproteaseaktivität nie selbst gemessen, so dass die Beteiligung von Serinproteasen in diesen Modellen spekulativ bleiben muss. Hingegen war es bei apoptotisch geschädigten U-937 Zellen möglich, eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 24 kDa zu isolieren, die für die DNA-Fragmentation verantwortlich zu sein schien und auch durch TPCK (nicht hingegen durch TLCK und PMSF) gehemmt werden konnte (Wright et al., 1994). Die Autoren berichten jedoch nicht über die Auswirkungen von TPCK auf die Zellvitalität der Zellen, so dass auch hier die Bedeutung dieser Serinprotease ungewiß ist.

### ***Beteiligung einer Serinprotease an der kälteinduzierten Apoptose***

Der Nachweis einer erhöhten Serinproteaseaktivität bei der kälteinduzierten Apoptose konnte im Rahmen dieser Arbeit klar geführt werden (Abb. 20 und 25B). Ähnlich wie bei der Proteasomaktivierung scheint auch die Aktivierung dieser bisher unbekannten Serinprotease eisenabhängig zu sein (Abb. 32). So konnte die Vorinkubation mit dem Eisenchelator Desferal die kälteinduzierte Aktivierung der Serinprotease hemmen (Abb. 22B), hatte aber keinen direkten Einfluß auf die Serinproteaseaktivität selbst (Abb. 26). Die im Rahmen der kälteinduzierten Apoptose aktivierte Serinprotease wies gewisse Ähnlichkeiten in der Inhibitorsensitivität mit der von Weaver et al. beschriebenen Serinprotease bei der Thymozytenapoptose auf (Weaver et al., 1993). Beide Proteasen ließen sich durch die Proteaseinhibitoren DCI,

PMSF und TPCK signifikant hemmen, und in beiden Modellen führte der Einsatz von PMSF und TLCK nicht wesentlich zur Verminderung des Zelltodes. Bei der kälteinduzierten Apoptose jedoch führte der Einsatz von DCI zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose (Abb. 17 und 18), während es bei der Apoptose der Thymozyten zu keiner Protektion der Zellen kam. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich um zwei unterschiedliche Proteasen handelt bzw. ihre Funktionen innerhalb der apoptotischen Kaskade unterschiedlich sind. Bei der im Rahmen der hypoxieinduzierten Apoptose von Rattentubuluszellen aktivierten Serinprotease (Dong et al., 2000) scheinen wenig Gemeinsamkeiten mit der bei kälteinduzierter Apoptose aktivierten Serinprotease zu bestehen. Die Aktivierung der Serinprotease in den Rattentubuluszellen (die selbst nicht gezeigt wurde) soll dabei zu einer Caspaseaktivierung mit konsekutivem Zelltod führen, welcher durch den Serinproteaseinhibitor TPCK gehemmt werden konnte, wohingegen DCI keinen Effekt hatte. Bei der kälteinduzierten Apoptose jedoch führte der Einsatz von DCI und nicht von TPCK (Abb. 14) zur Protektion der Zellen, und es kam auch nicht zu einer nachweisbaren Aktivierung von Caspasen (Abb. 24). Ob hingegen Ähnlichkeiten zwischen der von Wright et al. isolierten Serinprotease (Wright et al., 1994) und der bei kälteinduzierter Apoptose aktivierten Serinprotease bestehen, ist nicht sicher zu sagen. Beide Proteasen ließen sich durch TPCK hemmen, PMSF und TLCK blieben bei der von Wright et al. beschriebenen Protease jedoch ohne Effekt (im Gegensatz zu der bei kälteinduzierter Apoptose aktivierten Serinprotease). Ob TPCK allerdings auch die Zellschädigung verhindern konnte, wurde von den Autoren nicht berichtet. Letztlich muß die Art und Bedeutung der im Rahmen der kälteinduzierten Apoptose aktivierten Serinprotease noch offen bleiben.

### ***Bedeutung von Calpainen für die kälteinduzierte Apoptose***

In jenen Arbeiten, in denen die erhöhte Calpainaktivität am Gesamtorgan der Rattenleber klar gezeigt werden konnte, ließ sich zu allen Zeitpunkten der Konservierungsschädigung eine erhöhte Calpainaktivität nachweisen, d. h. diese trat sowohl nach kalter als auch nach warmer Ischämie und auch nach der Reperfusion des Organs auf (Kohli et al., 1997; Sindram et al., 1999). Das Ausmaß der Calpainaktivierung war dabei jeweils abhängig von der Dauer der Ischämie bzw. Reperfusion. Die Autoren schreiben die bei der Konservierungsschädigung auftretende Calpainaktivierung in erster Linie einer (wahrscheinlich eher ischämisch bedingten, s. u.) Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zu, schließen aber eine

mögliche Aktivierung durch Caspasen (durch Spaltung des physiologischen Calpaininhibitors Calpastatin) und Phospholipasen nicht aus. Bei der kälteinduzierten Apoptose von Leberendothelzellen hingegen scheinen diese calciumabhängigen cytosolischen Cysteinproteasen keine Rolle zu spielen. Es ließen sich weder eine Calpainaktivierung noch ein signifikanter Schutzeffekt durch den Calpaininhibitor Cbz-Val-Phe-Methylester nachweisen (Abb. 8, 9 und 28). Dieser scheinbare Widerspruch zu anderen Arbeiten lässt sich über die unterschiedlichen Schädigungsmuster in den Modellen erklären. Jene Arbeitsgruppen, die eine Aktivierung von Calpainen beschreiben, arbeiteten mit intakten, der kalten Ischämie ausgesetzten Gesamtlebern. In dieser Situation können sowohl die Hypothermie als auch die Hypoxie durch unterschiedliche Mechanismen zur Zellschädigung führen (Fuckert et al., 2000). Ischämie bzw. Hypoxie mit sich anschließender Reperfusion wirken sich vor allem auf die Hepatozyten aus (Thurman et al., 1993; Rosser & Gores, 1995) und führen über eine Erhöhung des intrazellulären Natriums (und auch, zu einem geringeren Anteil, Calciums (Brecht et al., 1992)) zum Zelltod (Carini et al., 1995; Frank et al., 2000; Fuckert et al., 2000). Die Aktivierung von Calpainen mag somit eine Folge dieser Calciumerhöhung sein (Kohli et al., 1997). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die Hypoxie und nicht die Hypothermie ursächlich für die gesehene Calpainaktivierung im Gesamtorgan ist. Zudem zeigte sich interessanterweise die erhöhte Calpainaktivität nicht nur nach kalter Ischämie des Organs, sondern auch - und sogar wesentlich höher - nach warmer Ischämie (Kohli et al., 1997).

### ***Bedeutung von Aspartatproteasen und Cathepsin B für die kälteinduzierte Apoptose***

In der vorliegenden Arbeit ergab sich kein Hinweis auf eine Beteiligung von Aspartatproteasen, die ebenfalls für die Konservierungsschädigung der Leber verantwortlich gemacht werden (Ferguson et al., 1993), an der kälteinduzierten Apoptose. Der Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A (10 µg/ml) zeigte keinerlei Schutzeffekt (Abb. 12). Die Tatsache, dass die Aspartatproteaseaktivität nach warmer Ischämie höher war als nach kalter (Ferguson et al., 1993), lässt vermuten, dass auch hier die Hypoxie und nicht die Hypothermie als der entscheidende Faktor zu sehen ist.

Ähnliches ist über eine Beteiligung von Cathepsin B zu sagen. Diese lysosomale Cysteinprotease wird in einigen wenigen Apoptosemodellen diskutiert (Faubion et al., 1999; Johnson, 2000), nicht jedoch bei der Konservierungsschädigung der Leber. So fand sich auch bei der kälteinduzierten Apoptose kein Hinweis auf eine

Aktivierung von Cathepsin B, wie die negativen Effekte der Inhibitoren z-FA.fmk und CA-074 sowie die fehlende Aktivitätserhöhung nach Kaltinkubation zeigten (Abb. 13 und 23).

### ***Bedeutung von Matrixmetalloproteasen für die kälteinduzierte Apoptose***

Auch eine Beteiligung von Matrixmetalloproteasen (MMP) konnte im Rahmen der kälteinduzierten Apoptose nicht nachgewiesen werden, weil der unspezifische extrazelluläre Proteaseinhibitor  $\alpha_2$ -Makroglobulin - u. a. ein MMP-Inhibitor (Raza & Cornelius, 2000) - keinerlei positiven Einfluss auf das Überleben der Zellen hatte (Abb. 11). Diese extrazellulären Proteasen, von denen gegenwärtig über zwanzig bekannt sind und deren gemeinsames Charakteristikum die Notwendigkeit von Metallionen (wie z. B. Zinkionen) zur Entfaltung ihrer katalytischen Aktivität ist (Skiles et al., 2001), wurden unter anderem für die Konservierungsschädigung der Leber verantwortlich gemacht (Upadhyia et al., 1997; Upadhyia & Strasberg, 1999). So soll die während der Kaltlagerung der Leber entstehende Aktindissoziation in den Endothelzellen zu einer Sekretion von MMPs in die Matrix mit anschließender Aktivierung führen. Dies soll in einer Abrundung der Endothelzellen, ihrer Ablösung von der Matrix und schlussendlich ihrem apoptotischen Zelltod resultieren. Obwohl in diesen Arbeiten die Aktivierung von MMPs eindeutig gezeigt wurde - genauer gesagt war es hier eine Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 (auch bekannt als Gelatinasen A und B) - so konnte deren Bedeutung für die Konservierungsschädigung der Leberendothelzellen nicht überzeugend dargestellt werden, insbesondere wurde nicht differenziert, ob diese MMP-Freisetzung Ursache oder Folge der Zellschädigung war.

### ***Bedeutung von Caspasen für die kälteinduzierte Apoptose***

Eine Aktivierung von Caspasen im Zusammenhang mit der hepatischen Konservierungsschädigung wurde bisher nur während der Reperfusion des Organs beschrieben (Natori et al., 1999; Rentsch et al., 2001). Von diesen Cysteinproteasen, von denen zur Zeit mindestens vierzehn bekannt und klassifiziert sind, ist ihr prominentester Vertreter die Caspase 3, ein als so genannte Effektorprotease wirkendes Enzym (Fadeel et al., 2000). Bei der kälteinduzierten Apoptose von sinusoidalen Rattenleberendothelzellen scheint es jedoch nicht zu einer Aktivierung von Caspasen zu kommen. z-VAD.fmk - ein spezifischer Pancaspaseinhibitor - zeigte keine

Protektion. Jedoch konnte in Anwesenheit des Caspase 3-spezifischen Inhibitors z-DEVD.fmk ein nahezu kompletter Schutzeffekt erzielt werden (Abb. 10). Dieses scheinbar paradoxe Resultat lässt sich höchstwahrscheinlich über einen unspezifischen Effekt des z-DEVD.fmk erklären, denn es ist bekannt, dass dieser Inhibitor in höheren Konzentrationen auch andere Proteasen wie z. B. Cathepsin B hemmen kann (Ekert et al., 1999). Die hier verwendete Konzentration dieses Inhibitors war mit 100  $\mu\text{M}$  sehr hoch, und es zeigte sich auch kein Schutzeffekt in einem Konzentrationsbereich von 10-25  $\mu\text{M}$  (nicht dargestelltes Ergebnis). Darüber hinaus sollte der Pancaspaseinhibitor z-VAD.fmk in der verwendeten Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) auch in der Lage sein, die Caspase 3-Aktivität zu unterdrücken. Bei der direkten Messung der Caspase 3-Aktivität ließ sich zudem keine erhöhte Aktivität feststellen (Abb. 24). Dies mag zum einen an einer durch Oxidation der SH-Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms bedingten Inaktivierung der Caspase 3 liegen - ist aber durch die Verwendung des Reduktionsmittels DTT im Proteaseassay eher unwahrscheinlich - oder zum anderen - und letztlich wesentlich wahrscheinlicheren - an einer fehlenden Aktivierung der Caspase 3 im Rahmen der kälteinduzierten Apoptose von Leberendothelzellen.

### ***Schlussfolgerung***

Die Sequenz Kaltinkubation/Wiedererwärmung von kultivierten sinusoidalen Rattenleberendothelzellen führt zur Induktion eines apoptotischen Zelltodes, der über eine eisenabhängige Freisetzung von ROS zur Aktivierung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms und einer Serinprotease führt. Die Aktivierung des Proteasoms ist dabei von zentraler Bedeutung für den Zelltod, während die (bisher unbekannte) Serinprotease wahrscheinlich von untergeordneter Rolle ist. Die Konservierungslösungen HTK und UW schützen nicht vor diesem Schädigungstyp. Im Gegenteil, sie beschleunigen die kälteinduzierte Apoptose nur. Diese Fakten suggerieren neue Handlungsweisen in der Lebertransplantation. Entweder die Verwendung eines Eisenchelators zur Verhinderung einer Proteaseaktivierung oder der Einsatz von Proteaseinhibitoren zur Unterdrückung der Proteaseaktivität sollten in Betracht gezogen werden, um Endothelzellschädigungen, konsekutive Mikrozirkulationsstörungen und letztlich die Schädigung des Gesamtorgans zu vermindern und somit die Wahrscheinlichkeit des primären Transplantatversagens nach Implantation des Organs zu minimieren.

## 6. Zusammenfassung

Die moderne Lebertransplantation wäre ohne die Verwendung von Hypothermie (4°C) und Konservierungslösungen nicht möglich. Trotz der Fortschritte der Lebertransplantation in den letzten Jahren kommt es auch heute noch zur Konservierungsschädigung der Leber; von dieser sind vor allem die Leberendothelzellen betroffen.

Der Schädigungsfaktor Kälte/Wiedererwärmung führt in kultivierten sinusoidalen Leberendothelzellen über einen Anstieg des chelatisierbaren Eisenpools mit konsekutiver Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zur kälteinduzierten Apoptose. Ob und, falls ja, welche Proteasen an diesem Prozess beteiligt sind, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. In kultivierten konfluenten Rattenleberendothelzellen wurden zunächst verschiedene Proteaseinhibitoren eingesetzt und ihr Effekt auf die Vitalität und Morphologie der Zellen nach Kaltinkubation beurteilt. Hierbei wurde ein sehr guter Schutzeffekt durch den Serin- (und Cystein-) Proteaseinhibitor 3,4-Dichloroisocumarin (DCI) beobachtet. In der Folge wurden die einzelnen Proteaseaktivitäten, insbesondere Serin- und Cysteinproteaseaktivitäten, fluorimetrisch bestimmt. Es ließ sich jedoch keine erhöhte Aktivität von Calpainen, Caspasen, Cathepsin B oder auch Aspartatproteasen nachweisen. Stattdessen konnte eine erhöhte Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC und eine Suc-Ala-Ala-Ala-AMC spaltende Aktivität nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei diesen beiden (erhöhten) Aktivitäten um zwei unterschiedliche Proteasen handelt. Die Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC spaltende Aktivität, wahrscheinlich für den Zelltod bedeutsamer, ließ sich durch DCI und die Proteasominhibitoren Lactacystin und MG-132 signifikant inhibieren. Sie wies einen  $K_m$ -Wert von ca. 25  $\mu$ M für Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC und einen  $K_i$ -Wert von ca. 25 nM für MG-132 auf und konnte über Immunopräzipitation mit einem Antiproteasomantikörper als Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms identifiziert werden. Bei der anderen Protease handelt es sich um eine Serinprotease von bisher unbekannter Art und Bedeutung. Die Aktivierung beider Proteasen (nicht jedoch ihre Aktivität) erwies sich als eisenabhängig.

Die Hemmung des Proteasoms (und seiner eisenabhängigen Aktivierung) kann die Schädigung der Leberendothelzellen deutlich reduzieren. Der Einsatz von Eisenchelatoren und/oder Proteasominhibitoren in den Konservierungslösungen während der Kaltlagerung der Leber könnte also über eine Verminderung von Endothelschädigung und Mikrozirkulationsstörungen zur Verbesserung der Konservierung führen und das unmittelbare Transplantatversagen reduzieren.



## 7. Literatur

Abouna, G.M., Koo, C.G., Howanitz, L.F., Ancarani, E., Porter, K.A. (1971): Successful orthotopic liver transplantation after preservation by simple hypothermia. *Transplant. Proc.* 3, 650-653.

Arai, M., Peng, X.X., Currin, R.T., Thurman, R.G., Lemasters, J.J. (1999): Protection of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury by prostaglandin E<sub>2</sub> derived from Kupffer cells. *Transplantation* 68, 440-445.

Arii, S., Imamura, M. (2000): Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 7, 40-48.

Belzer, F.O., Southard, J.H. (1988): Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45, 673-676.

Bilzer, M., Gerbes, A.L. (2000): Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J. Hepatol.* 32, 508-515.

Blankensteijn, J.D., Terpstra, O.T. (1991): Liver preservation: the past and the future. *Hepatology* 13, 1235-1250.

Blouin, A., Bolender, R.P., Weibel, E.R. (1977): Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* 72, 441-455.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brecht, M., Brecht, C., de Groot, H. (1992): Late steady increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> preceding hypoxic injury in hepatocytes. *Biochem. J.* 283, 399-402.

Carafoli, E., Molinari, M. (1998): Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys. Res. Commun.* 247, 193-203.

Carini, R., Bellomo, G., Benedetti, A., Fulceri, R., Gamberucci, A., Parola, M., Dianzani, M.U., Albano, E. (1995): Alteration of Na<sup>+</sup> homeostasis as a critical step in the

development of irreversible hepatocyte injury after adenosine triphosphate depletion. *Hepatology* 21, 1089-1098.

Clavien, P.A. (1998): Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 28, 281-285.

Clavien, P.A., Harvey, P.R., Strasberg, S.M. (1992): Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 53, 957-978.

Conconi, M., Friguet, B. (1997): Proteasome inactivation upon aging and on oxidation - effect of HSP 90. *Mol. Biol. Rep.* 24, 45-50.

D'Alessandro, A.M., Southard, J.H., Love, R.B., Belzer, F.O. (1994): Organ preservation. *Surg. Clin. North Am.* 74, 1083-1095.

De Groot, H., Anundi, I., Littauer, A. (1989): Hypoxia-reoxygenation injury and the generation of reactive oxygen in isolated hepatocytes. *Biomed. Biochim. Acta* 48, S11-S15.

De Groot, H., Brecht, M. (1991): Reoxygenation injury in rat hepatocytes: mediation by  $O_2/H_2O_2$  liberated by sources other than xanthine oxidase. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 372, 35-41.

DeMartino, G.N., Slaughter, C.A. (1999): The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 22123-22126.

Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A.M. (1999): Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J. Exp. Med.* 189, 1815-1822.

Dong, Z., Saikumar, P., Patel, Y., Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A. (2000): Serine protease inhibitors suppress cytochrome c-mediated caspase-9 activation and apoptosis during hypoxia-reoxygenation. *Biochem. J.* 347, 669-677.

Ekert, P.G., Silke, J., Vaux, D.L. (1999): Caspase Inhibitors. *Cell Death Differ.* 6, 1081-1086.

Fadeel, B., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2000): The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 14, 1514-1525.

Fan, X.M., Wong, B.C., Wang, W.P., Zhou, X.M., Cho, C.H., Yuen, S.T., Leung, S.Y., Lin, M.C., Kung, H.F., Lam, S.K. (2001): Inhibition of proteasome function induced apoptosis in gastric cancer. *Int. J. Cancer* 93, 481-488.

Faubion, W.A., Guicciardi, M.E., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Svingen, P.A., Kaufmann, S.H., Gores, G.J. (1999): Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J. Clin. Invest.* 103, 137-145.

Fenteany, G., Schreiber, S.L. (1998): Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.* 273, 8545-8548.

Ferguson, D.M., Gores, G.J., Bronk, S.F., Krom, R.A. (1993): An increase in cytosolic protease activity during liver preservation. Inhibition by glutathione and glycine. *Transplantation* 55, 627-633.

Frank, A., Rauen, U., de Groot, H. (2000): Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. *J. Hepatol.* 32, 58-66.

Fuckert, O., Rauen, U., de Groot, H. (2000): A role for sodium in hypoxic but not in hypothermic injury to hepatocytes and LLC-PK<sub>1</sub> cells. *Transplantation* 70, 723-730.

Gao, W., Bentley, R.C., Madden, J.F., Clavien, P.A. (1998): Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 27, 1652-1660.

Gardner, R.C., Assinder, S.J., Christie, G., Mason, G.G., Markwell, R., Wadsworth, H., McLaughlin, M., King, R., Chabot-Fletcher, M.C., Breton, J.J., Allsop, D., Rivett, A.J. (2000): Characterization of peptidyl boronic acid inhibitors of mammalian 20S and 26S proteasomes and their inhibition of proteasomes in cultured cells. *Biochem. J.* 346, 447-454.

Gizewski, E.R., Rauen, U., Kirsch, M., Reuters, I., Diederichs, H., de Groot, H. (1997): Rapid decrease in cellular sodium and chloride content during cold incubation of cultured liver endothelial cells and hepatocytes. *Biochem. J.* 322, 693-699.

Goodrich, E.O., Jr., Welch, H.F., Nelson, J.A., Beecher, T.S., Welch, C.S. (1956): Homotransplantation of the canine liver. *Surgery* 39, 244-251.

Grimm, L.M., Goldberg, A.L., Poirier, G.G., Schwartz, L.M., Osborne, B.A. (1996): Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 15, 3835-3844.

Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M., Davies, K.J. (1995): Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.* 270, 2344-2351.

Hirsch, T., Dallaporta, B., Zamzami, N., Susin, S.A., Ravagnan, L., Marzo, I., Brenner, C., Kroemer, G. (1998): Proteasome activation occurs at an early, premitochondrial step of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* 161, 35-40.

Hochachka, P.W. (1986): Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231, 234-241.

Hughes, F.M., Jr., Evans-Storms, R.B., Cidlowski, J.A. (1998): Evidence that non-caspase proteases are required for chromatin degradation during apoptosis. *Cell Death Differ.* 5, 1017-1027.

Hummel, V., Kallmann, B.A., Wagner, S., Fuller, T., Bayas, A., Tonn, J.C., Benveniste, E.N., Toyka, K.V., Rieckmann, P. (2001): Production of MMPs in human cerebral endothelial cells and their role in shedding adhesion molecules. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 320-327.

Jaeschke, H. (1991): Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem. Biol. Interact.* 79, 115-136.

Jaeschke, H. (1996): Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J. Hepatol.* 25, 774-780.

Johnson, D.E. (2000): Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* 14, 1695-1703.

Kerkweg, U., Jacob, M., de Groot, H., Mannherz, H.G., Rauen, U. (2003): Cold-induced apoptosis of rat liver endothelial cells: contribution of mitochondrial alterations. *Transplantation* 76, 501-508.

Kerkweg, U., Li, T., de Groot, H., Rauen, U. (2002): Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology* 35, 560-567.

Kidd, V.J., Lahti, J.M., Teitz, T. (2000): Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 11, 191-201.

Kohli, V., Gao, W., Camargo, C.A., Jr., Clavien, P.A. (1997): Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9354-9359.

Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L., Mignotte, B. (1995): The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9, 1277-1287.

Kumamoto, Y., Suematsu, M., Shimazu, M., Kato, Y., Sano, T., Makino, N., Hirano, K.I., Naito, M., Wakabayashi, G., Ishimura, Y., Kitajima, M. (1999): Kupffer cell-independent acute hepatocellular oxidative stress and decreased bile formation in post-cold-ischemic rat liver. *Hepatology* 30, 1454-1463.

Lamesch, P., Raygrotzki, S., Kehrer, G., Gubernatis, G., Bretschneider, H.J., Pichlmayr, R. (1990): Preservation of the liver with the HTK solution. *Transplant. Proc.* 22, 518-519.

Lee, D.H., Goldberg, A.L. (1998): Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell. Biol.* 8, 397-403.

Lemaster, J.J., Thurman, R.G. (1993): Hypoxia and reperfusion injury to liver. *Prog. Liver Dis.* 11, 85-114.

Lemasters, J.J., Bunzendahl, H., Thurman, R.G. (1995): Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transpl. Surg.* 1, 124-138.

Lin, K.I., Baraban, J.M., Ratan, R.R. (1998): Inhibition versus induction of apoptosis by proteasome inhibitors depends on concentration. *Cell Death Differ.* 5, 577-583.

Meriin, A.B., Gabai, V.L., Yaglom, J., Shifrin, V.I., Sherman, M.Y. (1998): Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 6373-6379.

Miller, D.K. (1997): The role of the caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin. Immunol.* 9, 35-49.

Moriga, T., Arii, S., Takeda, Y., Furuyama, H., Mizumoto, M., Mori, A., Hanaki, K., Nakamura, T., Fujioka, M., Imamura, M. (2000): Protection by vascular endothelial growth factor against sinusoidal endothelial damage and apoptosis induced by cold preservation. *Transplantation* 69, 141-147.

Myung, J., Kim, K.B., Crews, C.M. (2001): The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med. Res. Rev.* 21, 245-273.

Natori, S., Selzner, M., Valentino, K.L., Fritz, L.C., Srinivasan, A., Clavien, P.A., Gores, G.J. (1999): Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 68, 89-96.

Naujokat, C., Sezer, O., Zinke, H., Leclere, A., Hauptmann, S., Possinger, K. (2000): Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells. *Eur. J. Haematol.* 65, 221-236.

Noll, T., de Groot, H., Sies, H. (1987): Distinct temporal relation among oxygen uptake, malondialdehyde formation, and low-level chemiluminescence during microsomal lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 252, 284-291.

Pals-Rylaarsdam, R. (1998): The proteasome. *Curr. Biol.* 8, R902.

Patel, T., Gores, G.J. (1998): Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. *Liver Transpl. Surg.* 4, 42-50.

Patel, T., Gores, G.J., Kaufmann, S.H. (1996): The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.* 10, 587-597.

Petrat, F., Rauen, U., de Groot, H. (1999): Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. *Hepatology* 29, 1171-1179.

Qin, Z.H., Wang, Y., Kikly, K.K., Sapp, E., Kegel, K.B., Aronin, N., DiFiglia, M. (2001): Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J. Biol. Chem.* 276, 8079-8086.

Qiu, J.H., Asai, A., Chi, S., Saito, N., Hamada, H., Kirino, T. (2000): Proteasome inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* 20, 259-265.

Rauen, U., Elling, B., Gizewski, E.R., Korth, H.-G., Sustmann, R. (1997): Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 17-24.

Rauen, U., de Groot, H. (2002): Mammalian cell injury induced by hypothermia—the emerging role for reactive oxygen species. *Biol. Chem.* 383, 477-488.

Rauen, U., Hanssen, M., Lauchart, W., Becker, H.D., de Groot, H. (1993): Energy-dependent injury to cultured sinusoidal endothelial cells of the rat liver in UW solution. *Transplantation* 55, 469-473.

Rauen, U., Kerkweg, U., Weisheit, D., Petrat, F., Sustmann, R., de Groot, H. (2003): Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1664-1678.

Rauen, U., Petrat, F., Li, T., de Groot, H. (2000): Hypothermia injury/cold-induced apoptosis—evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low  $O_2^-/H_2O_2$  formation. *FASEB J.* 14, 1953-1964.

Rauen, U., Polzar, B., Stephan, H., Mannherz, H.G., de Groot, H. (1999): Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 13, 155-168.

Raza, S.L., Cornelius L.A. (2000): Matrix metalloproteinases and their native or pharmacologic inhibitors. *Adv. Dermatol.* 16, 185-208.

Reidlinger, J., Pike, A.M., Savory, P.J., Murray, R.Z., Rivett, A.J. (1997): Catalytic properties of 26S and 20S proteasomes and radiolabeling of MB1, LMP7, and C7 subunits associated with trypsin-like and chymotrypsin-like activities. *J. Biol. Chem.* 272, 24899-24905.

Rentsch, M., Beham, A., Iesalnieks, I., Mirwald, T., Anthuber, M., Jauch, K.W. (2001): Impact of prolonged cold ischemia and reperfusion on apoptosis, activation of caspase 3 and expression of bax after liver transplantation in the rat. *Transplant. Proc.* 33, 850-851.

Rosser, B.G., Gores, G.J. (1995): Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 108, 252-275.

Salahudeen, A.K., Joshi, M., Jenkins, J.K. (2001): Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells. *Transplantation* 72, 798-804.

Saraste, A. (1999): Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 24, 189-195.

Schutte, B., Ramaekers, F.C. (2000): Molecular switches that govern the balance between proliferation and apoptosis. *Prog. Cell Cycle Res.* 4, 207-217.

Shinohara, K., Tomioka, M., Nakano, H., Tone, S., Ito, H., Kawashima, S. (1996): Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem. J.* 317, 385-388.

Shringarpure, R., Grune, T., Davies, K.J. (2001): Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 1442-1450.

Sindram, D., Kohli, V., Madden, J.F., Clavien, P.A. (1999): Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Transplantation* 68, 136-140.

Sitte, N., Merker, K., von Zglinicki, T., Grune, T., Davies, K.J. (2000): Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I—effects of proliferative senescence. *FASEB J.* 14, 2495-2502.

Skiles, J.W., Gonnella, N.C., Jeng, A.Y. (2001): The design, structure, and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 8, 425-474.

Solary, E., Eymin, B., Droin, N., Haugg, M. (1998): Proteases, proteolysis, and apoptosis. *Cell Biol. Toxicol.* 14, 121-132.

Spiegel, H.U., Schleimer, K., Kranz, D., Oldhafer, K.J. (1998): Organ preservation with EC, HTK, and UW solutions in orthotopic liver transplantation in syngeneic rats. Part I: Functional parameters. *J. Invest. Surg.* 11, 49-56.

Squier, M.K., Miller, A.C., Malkinson, A.M., Cohen, J.J. (1994): Calpain activation in apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 159, 229-237.

Starzl, T.E., Marchioro, T.L., Porter, K.A. (1965): Experimental and clinical observations after homotransplantation of the whole liver. *Rev. Int. Hepatol.* 15, 1447-1480.

Tanaka, K., Chiba, T. (1998): The proteasome: a protein-destroying machine. *Genes Cells* 3, 499-510.

Thurman, R.G., Bunzendahl, H., Lemasters, J.J. (1993): Role of sinusoidal lining cells in hepatic reperfusion injury following cold storage and transplantation. *Semin. Liver Dis.* 13, 93-100.



Upadhyia, A.G., Harvey, R.P., Howard, T.K., Lowell, J.A., Shenoy, S., Strasberg, S.M. (1997): Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat. *Hepatology* 26, 922-928.

Upadhyia, G.A., Strasberg, S.M. (1999): Evidence that actin disassembly is a requirement for matrix metalloproteinase secretion by sinusoidal endothelial cells during cold preservation in the rat. *Hepatology* 30, 169-176.

Upadhyia, G.A., Strasberg, S.M. (2000): Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine-tryptophan-ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology* 31, 1115-1122.

Vairetti, M., Griffini, P., Pietrocola, G., Richelmi, P., Freitas, I. (2001): Cold-induced apoptosis in isolated rat hepatocytes: protective role of glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 954-961.

Vajdová, K., Graf, R., Clavien, P.A. (2002): ATP-supplies in the cold-preserved liver: A long-neglected factor of organ viability. *Hepatology* 36, 1543-1552.

Wagenknecht, B., Hermisson, M., Groscurth, P., Liston, P., Krammer, P.H., Weller, M. (2000): Proteasome inhibitor-induced apoptosis of glioma cells involves the processing of multiple caspases and cytochrome c release. *J. Neurochem.* 75, 2288-2297.

Weaver, V.M., Lach, B., Walker, P.R., Sikorska, M. (1993): Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes. *Biochem. Cell Biol.* 71, 488-500.

Wojcik, C. (1999): Proteasomes in apoptosis: villains or guardians? *Cell Mol. Life Sci.* 56, 908-17.

Wright, S.C., Wei, Q.S., Zhong, J., Zheng, H., Kinder, D.H., Larrick, J.W. (1994): Purification of a 24-kD protease from apoptotic tumor cells that activates DNA fragmentation. *J. Exp. Med.* 180, 2113-2123.

Wu, L.W., Reid, S., Ritchie, A., Broxmeyer, H.E., Donner, D.B. (1999): The proteasome regulates caspase-dependent and caspase-independent protease cascades during apoptosis of MO7e hematopoietic progenitor cells. *Blood Cells Mol. Dis.* 25, 20-29.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AMC	7-Amino-4-Methylcumarin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]- 1-propansulfonat
DCI	3,4-Dichloroisocumarin
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
HBSS	Hanks´ balanced salt solution
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- ethansulfonsäure
HTK-Lösung	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung
MDA	Malondialdehyd
MMP	Matrixmetalloproteasen
MOPS	3-Morpholinopropansulfonäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

SD	Standardabweichung
SEC	Sinusoidale Endothelzellen
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TLCK	Tosyl-Lysin-Chloromethylketon
TPCK	Tosyl-Phenylalanin-Chloromethylketon
UW-Lösung	University of Wisconsin-Lösung

## **9. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum September 2000 bis März 2003 im Institut für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen angefertigt.

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen bedanken, die mich in dieser Zeit unterstützt und gefördert haben.

An erster Stelle gilt mein Dank der Betreuerin meiner Arbeit, Frau Priv.-Doz. Dr. med. U. Rauen, für die Überlassung des interessanten Themas, die ausgezeichnete, engagierte wissenschaftliche Begleitung meiner Arbeit, für ihre stete Ansprechbarkeit und Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion auftretender Fragen.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. de Groot, Direktor des Instituts für Physiologische Chemie, danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut wissenschaftlich zu arbeiten. Ich danke ihm für seine mir in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung und Wertschätzung meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie, auch den namentlich nicht erwähnten, möchte ich herzlich für ihre Kollegialität und Hilfsbereitschaft danken.

Eva Hillen, Martina Brachvogel und Britta Büchner danke ich für ihre ausgezeichnete und geduldige Einarbeitung und für die tolle Zusammenarbeit im Labor.

Birgit Lammers, Sebastian Klempt und Uta Kerkweg möchte ich danken für ihr Vertrauen und ihre Hilfsbereitschaft ebenso wie für den freundschaftlichen Zusammenhalt untereinander, der für jeden von uns sicherlich vieles leichter gemacht hat.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meiner Freundin, Frau Sonja Kinner. Sie haben mir stets Rückhalt gegeben und Verständnis entgegengebracht. Ich danke ihnen für ihre Begleitung während der letzten Jahre, ihren Glauben an mich und die Unterstützung, die sie mir gewährt haben.

## **10. Lebenslauf**

<b>Name</b>	Thorsten Roland Döppner, wohnhaft in Göttingen
<b>geboren am</b>	20.12.1976 in Duisburg
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch

### **Schulbildung**

<b>1983-1987</b>	Mariengrundschule, Duisburg
<b>1987-1996</b>	Franz-Haniel-Gymnasium, Duisburg
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Bundeswehrdienst**

<b>1996-1997</b>	Sanitätsdienst, Halle a. d. Saale und Essen
------------------	---

### **Universitäre Ausbildung**

<b>1997-2004</b>	Studium der Humanmedizin an der Universität Duisburg-Essen
<b>05/2004</b>	Abschluss: Staatsexamen Medizin
<b>10/2004-03/2006</b>	M.Sc./PhD/MD-PhD Neuroscience- Program Göttingen (International Max Planck Research School)

### **Promotion**

<b>2000-2003</b>	Promotion am Institut für Physiologische Chemie, Essen
------------------	---